

Kontraktionsverhalten isolierter Kardiomyozyten adulter Ratten bei starker Hyperglykämie und oxidativem Stress

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Philipp Engel
aus Arnsberg

Gießen 2008

Aus dem Physiologischen Institut des Fachbereichs Medizin der
Justus-Liebig-Universität Gießen

Gf. Direktor: Prof. Dr. Dr. H.-M. Piper

Gutachter: Prof. Dr. Schlüter

Gutachter: Prof. Dr. Dill

Tag der Disputation: 29.09.2008

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
1 EINLEITUNG	5
1.1 Die diabetische Kardiomyopathie	5
1.2 Steuerung der Herzkontraktion	7
1.3 Stickstoff, ROS und TIP39	8
1.4 Zielsetzungen der Arbeit	10
2 MATERIAL	12
2.1 Chemikalien	12
2.2 Medien	13
2.3 Lösungen	14
2.4 Geräte und Laborbedarf	14
2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur	14
2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion	15
2.4.3 Sonstige Geräte	15
2.4.4 Verbrauchsmaterialien	15
2.4.5 Software	15
3 METHODEN	17
3.1 Präparation und Inkubation der isolierten Kardiomyozyten	17
3.1.1 Präparation der isolierten Kardiomyozyten	17
3.1.2 Inkubation der isolierten Kardiomyozyten	18
3.2 Messung der Kardiomyozytenkontraktionen im elektrischen Feld	19
3.2.1 Probenvorbereitung	19

3.2.2	Elektrische Stimulation und Steuerung der Kardiomyozyten-Kontraktion	19
3.2.3	Messung der Kontraktionsparameter	20
3.2.4	Messprotokoll	22
3.2.5	Statistik	22
4	ERGEBNISSE	24
4.1	Einfluss einer starken Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten der isolierten Kardiomyozyten	24
4.1.1	Versuchsaufbau	24
4.1.2	Einfluss der Hyperglykämie auf die verschiedenen gemessenen Kontraktionsparameter	24
4.1.2.1	Einfluss der Hyperglykämie auf die Kontraktionsgeschwindigkeit	24
4.1.2.2	Einfluss der Hyperglykämie auf die Relaxationsgeschwindigkeit	26
4.1.2.3	Einfluss der Hyperglykämie auf die relative Zellverkürzung	28
4.2	Einfluss von Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten isolierter Kardiomyozyten unter Last	31
4.2.1	Versuchsaufbau	31
4.2.2	Einfluss einer moderaten Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten unter Last	31
4.2.3	Einfluss einer starken Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten unter Last	34
4.3	Einfluss der extrazellulären Kalziumkonzentration auf das Kontraktionsverhalten der isolierten Herzmuskelzellen unter starker Hyperglykämie	36
4.3.1	Versuchsaufbau	36
4.3.2	Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten bei starker Hyperglykämie bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen	36
4.4	Einfluss einer starken Hyperglykämie auf die β-adrenerge Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten	39
4.4.1	Versuchsaufbau	39

4.4.2	Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten unter Hyperglykämie bei verschiedenen Isoprenalin-Konzentrationen	39
4.5	Einfluss verschiedener TIP39 Konzentrationen auf das Kontraktionsverhalten der isolierten Kardiomyozyten	42
4.5.1	Versuchsaufbau	42
4.5.2	Einfluss verschiedener TIP39 Konzentrationen auf die Kontraktionseigenschaften der Kardiomyozyten bei Normoglykämie und starker Hyperglykämie	42
4.5.3	Einfluss von TIP39 auf die Kontraktionseigenschaften der Kardiomyozyten bei verschiedenen Kontraktionsfrequenzen	46
4.6	Zusammenfassung der Ergebnisse	49
5	DISKUSSION	50
5.1	Einfluss einer starken Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten isolierter Kardiomyozyten	50
5.2	Einfluss von Hyperglykämie auf die maximal Belastbarkeit	53
5.3	Einfluss von TIP39 auf das Kontraktionsverhalten der isolierten Kardiomyozyten unter Normo- und Hyperglykämie	57
6	LITERATUR	59
7	ZUSAMMENFASSUNG	65
8	LEBENS LAUF	69
9	DANKSAGUNG	70

Abkürzungsverzeichnis

• ATP	Adenosintriphosphat
• BMI	Body Mass Index
• cAMP	cyclisches Adenosidmonophosphat
• cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
• Con-Vel	Kontraktionsgeschwindigkeit
• EDRF	endothelium-derived-relaxing-factor
• eNOS	endotheliale-NO-Synthase
• FCS	fetal calf serum, fötales Kälber Serum
• FLHW	full length half wide = R50 – T50TP
• KHK	koronare Herzkrankheit
• L-NA	L-nitro-arginine
• LVDP	left ventricular developed pressure
• NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
• NO	Stickstoffmonoxid
• PAS	perjodic-acid-shiff
• PTH	Parathormon
• PTHrP	Parathormon-related-Peptide
• R50	R50-Wert, also die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 50% der gesamten Zellverkürzungsstrecke
• Rel-Vel	Relaxationsgeschwindigkeit
• ROS	reactive oxygen species
• SERCA	sarkoendoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase
• SNAP	S-nitroso-N-acetylpenicillamine
• STZ	Streptozotozin
• TIP39	Tuberoinfundibular Peptide of 39 Residues
• TTP	time to peak, Zeit von Beginn der Kontraktion bis zu maximalen Kontraktion in Millisekunden
• $\Delta L/L$	relative Zellverkürzung

1 Einleitung

Diabetische Erkrankungen und Folgeerkrankungen nehmen seit Jahren an Häufigkeit und damit an klinischer Bedeutung zu. Laut statistischem Bundesamt waren 2004 3% aller Todesfälle in Deutschland auf einen Diabetes zurück zu führen. Dies ist eine Steigerung von 25% gegenüber dem Jahr 1980 [Pressemitteilung Nr. 478 des Statistischen Bundesamtes vom 11. November 2005: „Zahl der Diabetiker-Toten weiter ansteigend“].

Direkt organschädigend dabei sind die mit der Krankheit assoziierten hyperglykämischen Zustände, die häufigsten Schädigungen und damit Komplikationen Mikro- und Makroangiopathien. Die darunter wieder Häufigste ist die koronare Herzkrankheit (KHK). 55% aller Diabetiker versterben an einem Herzinfarkt [Herold Innere Medizin 2006, Kapitel Diabetes mellitus].

1.1 Die diabetische Kardiomyopathie

Bereits seit 1972 durch Rubler und bei der Auswertung der Framingham Heart Study gelangte man zu der Erkenntnis, dass es beim Diabetiker noch andere, von den Angiopathien unabhängige oder zumindest nicht direkt darauf zurück zu führende Veränderungen am Herzen geben müsse. Auch Diabetiker ohne KHK, ohne Hypertonus oder sonstige Zeichen angiopathischer Veränderungen zeigten eine deutlich höhere Anfälligkeit für kardiale Ereignisse [Rubler S. et al., 1972; Kannel W.B. et al., 1974].

Dazu passen eine Reihe gefundener anatomisch-pathologischer Veränderungen. So haben Diabetiker sehr viel häufiger eine vermehrte linksventrikuläre Muskelmasse mit erhöhter arterieller Steifigkeit (diastolische Compliancestörung), sowie eine reduzierte systolische Funktion als Nichtdiabetiker. Diese Veränderungen bleiben auch nach Korrektur des Body Mass Index (BMI) und des arteriellen Bluthochdrucks persistent. Jeder zweite asymptomatische Diabetiker weist außerdem Anomalien der diastolischen Funktion auf [Diagnostik und Therapie von Herzerkrankungen bei Diabetes mellitus, Evidenzbasierte Leitlinie DDG – Aktualisierung 05/2006].

Auch erkannte man schon früh verschiedene histopathologische Veränderungen am diabetischen Herzen. Sowohl am Tiermodell als auch an den histopathologisch untersuchten Herzen verstorbener Diabetiker fanden sich interstitielle Fibrosen, hypertrophe Myozyten und die Infiltration des Interstitiums mit in der Perjodic-acid-shiff-Färbung (PAS) positivem Material. Das Ausmaß der Veränderungen korrelierte mit der Dauer des Diabetes [Saito K. et al., 1984; van Hoeven K.H. et al., 1991].

Die Existenz dieses als diabetische Kardiomyopathie bezeichneten Krankheitsbildes ist heute unstrittig und die klinische Relevanz wird immer deutlicher. Ältere Studien zeigen immerhin schon bei 30% der untersuchten Typ 2 Diabetiker eine diastolische Dysfunktion [Di Bonito P. et al., 1996; Beljic T., 1994], mit sensitiveren neuen Doppleruntersuchungen finden sich solche bei bis zu 60% der untersuchten Probanden [Redfield M.M. et al., 2003; Poirier P. et al., 2001].

Die genauen Ursachen der beschriebenen Veränderungen sind noch nicht vollständig geklärt. Man vermutet unter anderem Zusammenhänge mit der Kalzium-Homöostase sowie mit der Bildung freier Sauerstoffradikale (ROS).

Vor allem der Einfluss auf die Relaxation scheint von Bedeutung zu sein [Davidoff A.J. et al., 1997; Ren J. et al., 1997; Soltanpour G., 2004]. Dies passt auch zu den oben beschriebenen makroskopischen und histopathologischen Veränderungen.

Eine herabgesetzte Herzfunktion im Rahmen der diabetischen Kardiomyopathie macht sich, wie alle kardiomyopathischen Störungen, am ehesten bei Belastung bemerkbar. Das Herz muss, unter anderem durch die vaskulären pathologischen Veränderungen, gegen einen erhöhten Widerstand pumpen.

Ventrikuläre Dysfunktionen werden als ein frühes Zeichen der diabetischen Kardiomyopathie angesehen [Raev D.C., 1994]. Eine solche Störung kann oft bereits beim asymptomatischen, medikamentös gut eingestellten Patienten mittels verschiedener Doppleruntersuchung als subklinische Störung nachgewie-

sen werden [Poirier P. et al., 2001; Schannwell C.M. et al., 2002; Redfield M.M., 2003].

1.2 Steuerung der Herzkontraktion

Bereits 1882 wurde die Bedeutung des Kalziums-Stoffwechsels für die Herzkontraktion von Ringer erkannt und beschrieben [Ringer S., 1882].

Das Kalzium-Ion ist das Bindeglied zwischen elektrophysiologischem und mechanischem Geschehen, der so genannten Elektro-Mechanischen-Kopplung. Dies geschieht durch Bindung des Kalziums an Troponin C wodurch es zu Querbrückenaktivierung und damit zur Kontraktion kommt.

Die intrazelluläre Kalzium-Konzentration und damit der während der Kontraktion stattfindende Kalziumeinstrom sind dabei für die Stärke der Kontraktion verantwortlich.

Die Zelle hat zwei Kalziumquellen. Zum einen intrazellulär das sarkoplasmatische Retikulum, zum anderen den Extrazellularraum. Der Herzmuskel ist dabei wesentlich stärker als der Skelettmuskel auf das extrazelluläre Kalzium angewiesen, da die Freisetzung von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum von dem aus dem Extrazellularraum einströmenden Kalzium getriggert wird und so zur Kontraktion führt [Callewaert G., 1992; Barry W.H. et al., 1993].

Während eines Aktionspotentials kommt es zur Depolarisation der Zellmembran und damit hauptsächlich durch spannungsgetriggerte, sarkolemmnale Kalziumkanäle vom L-Typ, aber auch durch einen Natrium/Kalzium-Austauscher (NCX), zum Einstrom von Kalzium aus dem Extra- in den Intrazellularraum. Die Menge des einströmenden Kalziums wird dabei erstens von der Öffnungswahrscheinlichkeit der Kalziumkanäle bestimmt, welche cAMP vermittelt durch β -adrenerge Stimulation gesteuert werden, und zweitens durch den Konzentrationsgradienten des Kalziums auf beiden Seiten der Zellmembran.

Der Herzmuskel relaxiert bei Absinken der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration. Dies geschieht durch primär-aktiven Transport durch eine Ca^{2+} -

ATPase über die Zellmembran nach außen, durch den Natrium-Kalium-Austauscher und durch einen ebenfalls ATP-abhängigen Transport ins Sarkoplasmatische Retikulum [Hess P., 1988].

Eine Reihe von Arbeiten hat Veränderungen in der elektromechanischen Kopplung und der Kalzium-Homöostase als einen der Hauptverursacher der Kontraktionsverschlechterung im insuffizienten Myokard bei verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz beschrieben [Beuckelmann D.J. et al., 1992; Kamezin et al., 1998; Morgan et al., 1990].

Auch gibt es Hinweise darauf, dass sich bei chronischer Hyperglykämie im Tierversuch der Kalziumhaushalt nachhaltig verändert [Ren et al., 1997].

Die Steuerung der Herzkontraktion ist ein multimodales, multifaktorielles Geschehen. Einer der wichtigsten Mechanismen ist die Katecholaminwirkung.

So erhöht sich unter anderem die Öffnungswahrscheinlichkeit der in 1.2 schon erwähnten sarkolemmalen, spannungsgetriggerten Kalziumkanäle durch β -adrenerge Stimulation.

Im Mittelpunkt dieses Regelkreises steht die in der Zellmembran lokalisierte Adenylatcyclase. Nach Aktivierung von β -Rezeptoren wird ein stimulierendes G-Protein gebildet, welches wiederum die membranständige Adenylatcyclase aktiviert. Diese katalysiert die Bildung von cAMP aus ATP. cAMP aktiviert als second-messenger Proteinkinasen, die wiederum die Phosphorylierung des sarkolemmalen Kalziumkanals katalysieren und damit die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen. Bei gleicher Endstrecke kann über die Adenylatcyclase auch eine Herabsetzung der Öffnungswahrscheinlichkeit erfolgen, wenn nach Aktivierung eines muskarinergen Rezeptors ein inhibitorisches G-Protein gebildet wird, welches dann die Katalyse von ATP zu cAMP durch die Adenylatcyclase hemmt.

1.3 Stickstoff, ROS und TIP39

Die Bedeutung des Stickoxids (NO) als Botenstoff ist erst in den letzten Jahren näher untersucht und verstanden worden. Bereits seit 1879 wurde von William Murrell Nitroglycerin zur Behandlung der Angina Pectoris eingesetzt. Später

sollte sogar Alfred Nobel ironischerweise damit behandelt werden, weigerte sich jedoch den explosiven Stoff, den er ja gut kannte, als Arznei einzunehmen. Erst 1977 fand Ferid Murad heraus, dass NO die Aktivität von Guanylyl-Cyclase verstärkt und so die glatte Muskulatur entspannt.

Doch zunächst wurde 1980 durch Furchgott der vom Endothelium freigesetzte endothelium-derived-relaxing-factor (EDRF), welcher eine vasodilatatorische Wirkung hat, entdeckt und erst 1987 erkannten Furchgott, Moncada und Ignarro unabhängig voneinander, aber nahezu gleichzeitig, dass EDRF mit NO identisch ist. Die Forscher bekamen 1998 dafür den Nobelpreis in Medizin [Wells W. et al., 2000].

Eine Hyperglykämie induziert die Bildung von ROS, die durch veränderte Genexpression und Apoptoseinduktion unter anderem für die schon oben beschriebenen pathologischen Veränderungen am Myokard, und damit für die Funktionseinschränkung am diabetischen Herzen verantwortlich gemacht werden [Cai L. und Kang Y.J., 2001; Szabo C., 2002; Bell D.S.H., 2003].

Bei 15 mmol/l Glukose über 24 Stunden liegt die ROS Konzentration noch nahezu im Normbereich, bei 25 mmol/l erhöht sich die Konzentration signifikant und bei 30 mmol/l hat sie sich mehr als verdoppelt [Wenzel S. et al., 2005].

Usdin et al. isolierten 1999 aus dem Hypothalamus des Rindes ein Peptid, welches aus 39 Resten bestand und als Agonist auf den PTH2-Rezeptor wirkte. Dieses Peptid wird Tuberoinfundibuläres Peptid mit 39 Aminosäuren genannt (TIP39) [Usdin T.B. et al., 1999].

Aus phylogenetischen Untersuchungen weiß man, dass TIP39 mit Parathormon (PTH) und Parathormon-related-Peptide (PTHrP) verwandt ist und TIP39 mit hoher Wahrscheinlichkeit sogar den Archetypen dieser Peptide darstellt [Usdin T.B. et al., 2003; Papasani M.R. et al., 2004].

Unsere Arbeitsgruppe konnte 2004 zeigen, dass TIP39 auch im Herzen exprimiert wird und dort ein Mediator kardialer Funktion, wirksam über die NO-Produktion, ist.

TIP39 allein hat einen nur geringen negativ inotropen Effekt, bei Anwesenheit von L-Nitro-Arginine (L-NA) ist jedoch ein sehr starker negativ inotroper Ef-

fekt zu beobachten. L-NA ist ein Hemmstoff der endothelialen-NO-Synthase (eNOS). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass es NO ist, welches diesen Effekt bedingt. Die negativ inotrope Wirkung von TIP39 wird durch die Blockade der NO-Produktion demaskiert.

Es wurden die gleichen Beobachtungen bei Versuchen am isolierten, ganzen Organ, wie auch bei isolierten Kardiomyozyten gemacht, wobei bei letzteren die relative Zellverkürzung als indirektes Maß für die Inotropie genommen wurde.

Auch wurde gezeigt, dass die Konzentration von cGMP, dem intrazellulären second messenger von NO, unter dem Einfluss TIP39 um fast das siebenfache anstieg. Ein solcher Anstieg konnte nicht beobachtet werden, wenn neben TIP39 auch L-NA präsent war, wohl aber als Wirkung von S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP), einem NO-Donor.

TIP39 ist also auf der einen Seite in der Lage, die cGMP Konzentration zu steigern, auf der anderen Seite hat es bei Blockade der NO Produktion einen starken negativ inotropen Effekt [Ross G. et al., 2005].

1.4 Zielsetzungen der Arbeit

1. Eine Reihe wissenschaftlicher Arbeiten hat sich mit der Wirkung chronischer, moderater Hyperglykämien befasst.

In der hier vorliegenden Arbeit wird die Hypothese geprüft, ob eine durch eine hohe Medium-Glukosekonzentration simulierte 24 stündige Blutzuckerspitze direkt die Kontraktionseigenschaften des isolierten Kardiomyozyten beeinflusst. Hohe Konzentrationen sind bei einem nicht behandelten oder noch nicht diagnostizierten Diabetes durchaus nicht ungewöhnlich, und durch die kurze Expositionszeit sind morphologische Veränderungen, die größtenteils erst durch die chronische Exposition entstehen dürften, noch nicht vorhanden.

2. Es wird der Frage nachgegangen, ob und wie die Veränderungen am Gesamtorgan mit Veränderungen in der Kontraktionskinetik der einzelnen Zelle unter Belastung bei einer starken Hyperglykämie zusammenhängen.

Auch sollen die Ergebnisse der unter Normalbedingungen erhobenen Messwerte mit denen, die unter Belastung erhoben wurden, verglichen werden, um Dysfunktionen unter Belastung zu demaskieren. Die Belastung wird durch eine erhöhte Mediumviskosität simuliert, gegen die die Kardiomyozyten bei jeder Kontraktion Kraft aufwenden müssen. Dies entspricht einer erhöhten Nachlast und damit einer Druckbelastung im Gesamtorgan.

3. Es wird der Einfluss einer starken Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen untersucht und damit, wie sich die Ansprechbarkeit auf Kalzium unter hyperglykämischen Bedingungen verändert.

4. Es wird die Wirkung einer starken Hyperglykämie auf die β -adrenerge Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten untersucht. Dies geschieht durch Zugabe von β 1- und β 2-Rezeptoren stimulierendem Isoprenalin.

5. ROS reagieren im Myokard mit NO zu Peroxinitrat (ONOO^-), ROS müssten also die NO Konzentration senken. Dies wäre ein möglicher Mechanismus, wodurch ROS neben der direkt schädigenden Wirkung dem diabetischen Herzen schaden könnten. TIP39 ist ein Mediator der kardialen Funktion über die NO Produktion. Wenn TIP39 unter Hemmung der eNOS durch L-NA einen starken negativ inotropen Effekt aufweist, schien es interessant zu untersuchen, wie sich TIP39 auf hyperglykämische Zellen auswirkt. Gesetzt den Fall, dass hier ROS eine Rolle spielen, müsste der Effekt von TIP39 und starker Hyperglykämie ähnlich TIP39 und L-NA sein.

Diese Hypothese wird in vorliegender Arbeit überprüft.

2 Material

2.1 Chemikalien

Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Carbogen	Messer Griesheim, Krefeld
Cytosin- β -Arabinofuranosid	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Merck, Darmstadt
FCS	PAA, Laboratories, Cölbe
Glukose	Sigma, Deisenhofen
HCl	Merck, Darmstadt
HEPES	Boehringer, Mannheim
Isoprenalin	Sigma, Deisenhofen
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Kollagenase Typ CLSII (332 U/mg)	Biochrom, Berlin
Karnitin	Sigma, Deisenhofen
Kreatin	Sigma, Deisenhofen
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt
Medium 199 / Earl's Salts	GibcoBRL, Eggenstein
NaCl	Merck, Darmstadt
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Invitrogen BRL, Eggenstein
Phenolrot	Sigma, Deisenhofen
Phenylephrin	Sigma, Deisenhofen
TIP39	Bachem, Torrance
Methylzellulose M _D 40000	Sigma, Deisenhofen

Die übrigen verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Boehringer (Mannheim), Gibco-BRL (Eggenstein), Merck (Darmstadt), Riedel-de-Haën (Seelze) und Sigma (Deisenhofen) in der höchsten erhältlichen Qualität bezogen. Alle Chemikalien wurden nach Herstellerangaben gelöst und aufbewahrt.

2.2 Medien

CCT-Kulturmedium:

M 199-HEPES gepuffert	x ml
Kreatin	5 mmol/l
Karnitin	2 mmol/l
Taurin	5 mmol/l
Streptomycin	100 µg/ml
Penicillin	100 IU/ml
Cytosin-β-Arabinofuranosid	100 µMol/l

M 199-HEPES gepuffert:

Medium 199 / Earl's Salts	9,8 g/l
HEPES	15 mmol/l
pH	7,4

Powell-Medium:

NaCl	110 mmol/l
NaHCO ₃	25 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
MgSO ₄	1,2 mmol/l
Glukose	11 mmol/l

Vorinkubationsmedium:

M 199-HEPES gepuffert	x ml
FCS	4 % (vol/vol)
Penicillin	100 IU/ml
Streptomycin	100 µg/ml

Cytosin-β-Arabinofuranosid wurde zur Hemmung der Proliferation verbliebener Nicht-Herzmuskelzellen zugesetzt. Alle Medien wurden sterilfiltriert, bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt und vor dem Gebrauch auf 37°C erwärmt.

2.3 Lösungen

Kollagenasepuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	25 mg
Kalzium-Stammlösung	12,5 µl

Rezirkulationspuffer:

Powell-Medium	40 ml
Kollagenase	30 mg

Zellkontraktionspuffer :

NaCl	125 mmol/l
KH ₂ PO ₄	1,2 mmol/l
KCl	2,6 mmol/l
MgSO ₄	1,2 mmol/l
CaCl ₂	1,0 mmol/l
Glukose	10 mmol/l
HEPES	10 mmol/l
pH	7,4

2.4 Geräte und Laborbedarf

2.4.1 Zellpräparation und Zellkultur

Präparationsbesteck	Aeskulap, Heidelberg
Langendorff-Apparatur	Eigenbau der Werkstatt des Physiologischen Institutes in Düsseldorf
Gewebehacker	Tissue Chopper 1086, Bachofer, Reutlingen
Nylonnetz	NeoLab, Heidelberg
Sterilbank	Kendro, Hanau
Brutschrank	Kendro, Hanau
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan

Zentrifuge	Digifuge GL, Heraeus-Christ, Osterode und Sigma 4K-1, Sigma, Osterode
------------	--

2.4.2 System zur Erkennung von Zellgrenzen während der Kontraktion

Interface INT4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Mikroskop	TMS-F von Nikon, Japan
Monitor	Philips
One Dimensional Camera ZK4	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Oszillograph	Scientific Instruments GmbH, Heidelberg
Stimulator	Physiologisches Labor des Physiologischen Institutes der J.-L.-Universität Gießen

2.4.3 Sonstige Geräte

Glasgeräte	Schott, Mainz
Heizrührer	Jahnke & Kunkel, Staufien
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetten	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Wasserbad	Julabo, Seelbach

2.4.4 Verbrauchsmaterialien

Kulturschalen (Typ Falcon 3001)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturschalen (Typ Falcon 3004)	Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Reaktionsgefäße	Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
Sterilfilter (0,2 µm Porenweite)	Schleicher & Schuell, Dassel

2.4.5 Software

Excel	Microsoft, Seattle, USA
-------	-------------------------

Image-Quant

MUCEL

SPSS

Molekular Dynamics, Krefeld

Scientific Instruments GmbH, Heidelberg

SAS Software-Version 6.11

3 Methoden

3.1 Präparation und Inkubation der isolierten Kardiomyozyten

3.1.1 Präparation der isolierten Kardiomyozyten

Isoliert wurden die Kardiomyozyten aus den Herzen adulter, 12 Wochen alter Wistar Ratten mit einem Körpergewicht von 300 – 350 g aus dem Tierstall des Physiologischen Institutes der JLU-Gießen [nach Piper H.M. et al., 1982].

Zunächst wurden die Tiere mit Diethylether narkotisiert und anschließend thorakotomiert. Die Herzen wurden mit eiskalter 0,15 M NaCl-Lösung gespült und oberhalb des Aortenbogens abgetrennt. Dann wurden die Lungenflügel abgetrennt und die Aorta frei präpariert.

An der Langendorff-Apparatur perfundierte man die Herzen mit 40 ml pro Herz durch langsam laufendes Powell-Medium (ca. 30 Tropfen/Minute) blutfrei, um dann für 30 Minuten Kollagenasepuffer (2-3 ml/min) rezirkulierend zu perfundieren.

Nach Ende der Perfusion wurden die Vorhöfe entfernt und in einem Gewebeshacker mit einer Schnittbreite von 0,7 mm zerkleinert. Dann trennte man das Gewebe in einem Kollagenasepuffer durch 15-20 minütiges, wiederholtes Ansaugen mit einer 10 ml Pipette weiter auf. Störende Bindegewebsstücke trennte man durch filtrieren durch ein Nylonnetz mit einer Porengröße von 200 µm ab. Zur weiteren Trennung der intakten Myozyten von Zelltrümmern und kleineren Zellen wurde das gewonnene Filtrat für drei Minuten bei 400 rpm zentrifugiert. Nach Resuspension des Sedimentes in Powell-Medium + 0,2 nmol/l CaCl₂ wurde dieser Vorgang wiederholt.

Es folgte die Aufkonzentration intakter Kardiomyozyten durch Sedimentation durch ein Medium hoher Dichte. Dazu teilte man die Zellsuspension auf vier Reagenzgläser auf, die jeweils zur Hälfte mit Powell-Medium + 4% Albumin + 1 mmol/l CaCl₂ gefüllt waren. Dies erfolgte vorsichtig mit Hilfe einer gebogenen Pasteurpipette. Zur Beschleunigung der Sedimentation wurden diese Reagenzgläser für 30 Sekunden bei 300 rpm zentrifugiert. Dabei bildete sich ein lockeres Sediment mit ca. 80% intakten, stabförmigen Myozyten am Boden der

Reagenzgläser. Dieses wurde zur Kurzzeitkultur in CCT-Kulturmedium mit 2%-iger Penicillin-Streptomycin-Lösung (die Zugabe von Antibiotika war notwendig, um bakterielle Verunreinigungen zu vermeiden), resuspendiert.

3.1.2 Inkubation der isolierten Kardiomyozyten

Das Ausplattieren der so gewonnenen Zellsuspension erfolgte in 35 mm Gewebekulturschalen, die bereits am Vorabend mit 1,5 – 2,0 ml Vorinkubationsmedium beschichtet und ca. 15-20 Stunden im Brutkasten vorinkubiert worden waren. Diese Vorbereitung war für eine effektive Anheftung der Zellen der ausplattierten Zellsuspension notwendig.

Das Vorinkubationsmedium wurde unmittelbar vor dem Ausplattieren aus den Kulturschalen abgesaugt.

Ausplattiert wurde 1 ml Zellsuspension pro Kulturschale, die dann für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert wurden. Diese Kurzzeitkultur war für eine Erholung der Zellen nach der Präparation notwendig, außerdem kam es während dieser Zeit zu einer weiteren Aufreinigung der Myozyten, da nur die stäbchenförmigen, intakten Kardiomyozyten sedimentierten und an dem Boden der vorinkubierten Schalen anhefteten. Runde, nicht intakte Zellen schwebten frei im Medium. Durch nachfolgendes Waschen durch zweimaliges Absaugen des Mediums und wieder Auffüllen mit CCT-Kulturmedium wurden die nicht intakten Zellen entfernt.

Nach dem Waschen wurden die Zellen je nach Versuchsaufbau entweder für weitere 24 Stunden, oder nur als Kurzzeitkultur mit verschiedenen Substanzen inkubiert und für die Kontraktionsmessungen genutzt.

Bei den Proben mit starker Hyperglykämie betrug die Konzentration an der Zelle nach Zugabe von Glukose 35 mmol/l, bei moderater Hyperglykämie 15 mmol/l. Normoglykämisch waren die Zellen ohne Glukosezusatz bei einer Glukosekonzentration von 5 mmol/l. Diese wurden bei den Messungen als Kontrollen genutzt.

3.2 Messung der Kardiomyozytenkontraktionen im elektrischen Feld

3.2.1 Probenvorbereitung

Unmittelbar vor Beginn der Messungen wurde die Kulturschale mit den zu messenden Zellen aus dem Inkubator genommen und das Medium abgesaugt. Das Medium wurde durch neues, zuvor erwärmtes Kulturmedium oder ein anderes, dem Versuchsaufbau entsprechendes Medium ersetzt.

Die weitere Behandlung der Proben erfolgte je nach Versuchsaufbau unterschiedlich. Dies ist im Ergebnisteil für die einzelnen Experimente aufgeführt.

3.2.2 Elektrische Stimulation und Steuerung der Kardiomyozyten-Kontraktion

Die Kulturschale mit den Kardiomyozyten wurde auf den Objektisch des Mikroskopes gestellt. Ein spezieller Deckel, in den vier Löcher an vier Punkten eines Quadrates gebohrt worden waren, wobei durch jeweils zwei Löcher die beiden Enden eines Drahtes hinein, beziehungsweise wieder hinaus gingen, wurde auf die Schale gesetzt. Diese Drähte waren auf der Unterseite des Deckels im Abstand von ungefähr 5 mm rechtwinklig abgebogen, so dass die Hauptstrecke des Drahtes in eben diesem Abstand parallel zu dem Deckel verlief und diese beim Aufsetzen des Deckel im Medium eintauchten. Die beiden Drähte wiederum verliefen parallel im Abstand von ca. 2 cm zueinander. Man nutzte den einen Draht als Kathode, den anderen als Anode. So konnte sich zwischen den beiden Drähten ein elektrisches Feld aufbauen, das durch die Form des Drahtes einem homogenen Feld angenähert war und einen relativ gleichmäßigen Stromfluss durch die Zellen zwischen den beiden Drähten gewährleistete.

Nun wurden die Drähte an einen Stimulator angeschlossen, der biphasische Stromstöße, ausgelöst von zwei 60 Volt starken entgegengesetzten Rechteckspannungen von jeweils 0,5 Sekunden Dauer, erzeugte. Dadurch wurden die Kardiomyozyten zur Kontraktion in der vorgegebenen Frequenz stimuliert und

gelegentlich auftretende Spontankontraktionen vereinheitlicht. Zellen, die nicht die vorgegebene Frequenz annahmen, wurden bei den Messungen nicht berücksichtigt.

Die Kontraktionsfrequenz konnte durch Veränderung der Stimulationsfrequenz beliebig variiert werden.

3.2.3 Messung der Kontraktionsparameter

Gemessen wurden die Kontraktionsparameter mit einer Geräteanordnung der Firma Scientific Instruments Heidelberg. Die Objektschale befand sich während der Messungen auf dem Objektisch des Mikroskops. Durch dieses konnte man die Kontraktionen beobachten. An das Mikroskop waren zwei Kameras angeschlossen: Eine Videokamera zur Beobachtung der Kontraktionen auf dem Monitor und eine Zeilenkamera, die hell-dunkel Unterschiede wahrnehmen konnte, so auch den hell-dunkel Unterschied zwischen Zelle und umgebendem Medium, was den Zellgrenzen entspricht. Zur Messung einer Kontraktion wurde die Kamera so positioniert, dass beide Zellenden in der eindimensionalen Zeile lagen. Dies geschah durch Drehen der Kulturschale und Drehen der Kamera, bis sich die Zelle genau in der Mitte des Okularbildes und dem darauf markierten Messbereich der Zeilenkamera befand.

Das in elektrische Signale umgewandelte Bild der Zeilenkamera wurde an einen Oszillographen übertragen. Die Ablenkzeit war fest auf 0,1 ms/cm, der Vertikalverstärker auf 5 V/div eingestellt. Die Bilddarstellung wurde intern getriggert, so erhielt man ein stehendes Bild.

Die von der Zeilenkamera wahrgenommenen Helligkeitsunterschiede und damit die Bewegung der Zellgrenzen wurden nun auf dem Oszillographen als unterschiedliche y-Auslenkungen dargestellt, die an ihrer horizontalen Bewegung als diese identifiziert werden konnten. So konnte man die Zellkontraktionen beobachten.

Betrieben wurde der Oszillograph als Zwei-Kanal-Oszillograph. Am zweiten Kanal lag eine feste Spannung des Interface an. Wenn diese abgelesen wurde, stellte sie sich als eine weitere Linie auf dem Bildschirm des Oszillographen

auf einer bestimmten Höhe dar, wenn nicht, zeigte der Oszillograph eine horizontale Linie auf der Höhe Null.

Diese besagte zweite Spannung wurde wie folgt über das externe Interface getriggert: Es wurde ein Triggermarker des Interface, ebenfalls durch eine Amplitude auf dem Oszillographen sichtbar gemacht, vor eine Amplitude des Zellbildes gesetzt. Wenn nun die ansteigende Spannung des Zellbildes den vom Triggermarker vorgegebenen Wert erreichte, also der Anstieg der Amplitude des Zellbildes die Amplitude des Triggermarkers erreichte, so begann der Oszillograph, die Interfacespannung am zweiten Kanal aufzuzeichnen. An dieser Stelle zeigte der Bildschirm des Oszillographen im Bild des zweiten Kanals nun einen Sprung der Horizontalen aus der Nullposition in die Höhe. Der bei Kontraktion eintretenden Positionsänderung der Amplitude des Zellbildes folgte so eine Änderung der Position, an der der Triggerwert erreicht wurde und damit veränderte sich ebenso die Stelle, an der die Horizontale nach oben sprang. Mit der anderen Zellkante verfuhr man ebenso. Die obere Horizontale bewegte sich nun im bewegten Bild an ihrer Kante vor und zurück.

Man konnte also anhand der horizontalen Ausschläge die Zelllänge und die Zellbewegungen bei Kontraktion beurteilen.

Das Signal wurde an einen Computer weitergeleitet und durch das Programm Mucell ausgewertet. Dieses ermittelte die aktuelle Zelllänge zu verschiedenen Zeitpunkten und erstellte daraus einen Graphen, der dann als Kurve die Kontraktion der Zelle darstellte. An der einsetzenden Längenverkürzung konnte der Computer so den Beginn einer Kontraktion erkennen. Aus jeweils fünf Kontraktionen bildete das Programm einen Mittelwert für folgende Werte:

- diastolische Zelllänge (maximale Zelllänge) in Mikrometern
- systolische Zelllänge (minimale Zelllänge) in Mikrometern
- „time to peak“, also Zeit von Beginn der Kontraktion bis zu maximalen Kontraktion in Millisekunden
- maximale Kontraktionsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde (erste Ableitung der Kontraktionskurve)
- maximale Relaxationsgeschwindigkeit in Mikrometern pro Sekunde

- T50-to-peak, also die Zeit vom Beginn der Zellkontraktion bis zur 50%-igen Zellkontraktion in Millisekunden
- R50-Wert, also die Zeit von der maximalen Kontraktion bis zur Relaxation um 50% der gesamten Zellverkürzungsstrecke

Als weitere Parameter wurden aus diesen Werten berechnet:

- $\Delta L/L$: Differenz aus diastolischer und systolischer Zelllänge (ΔL), angegeben in Prozent der Zellverkürzung, bezogen auf die diastolische Länge der Zelle.
- FWHL: Dauer der maximalen Kontraktion. Differenz aus R50 – T50-to-peak in Millisekunden (FWHL)

3.2.4 Messprotokoll

Pro Kulturschale wurden drei Zellen jeweils vier Mal im Abstand von 15 Sekunden mit drei verschiedenen Frequenzen von 1 Hz, 0,5 Hz und 2 Hz gemessen. Es wurden nur drei Zellen pro Kulturschale gemessen, um Ermüdungserscheinungen der Zellen durch die andauernde Stimulierung möglichst auszuschließen.

Die Mittelwerte der Kontraktionsparameter aus den vier Messungen einer Zelle bei einer Frequenz wurden zur weiteren Verarbeitung in das Programm Excel übertragen. Aus diesen jeweiligen ersten Mittelwerten wurden dann Mittelwert, Standardabweichung und Median bestimmt.

3.2.5 Statistik

Die beschriebenen Messungen wurden mit Messungen an Zellen verschiedener Präparationen zu einem Mittelwert zusammengefasst, aus dem Programm Mucell in das Programm Excel exportiert und mit dem Programm SPSS ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwert und Standardfehler.

Wurden zwei Gruppen verglichen, arbeitete man mit einem gepaarten T-Test. Bei Vergleichen mehrerer Gruppen in einem Experiment wurde nach Varianzanalyse (ANOVA) und dann als post-hoc-Test ein Student-Newman-Keuls-Test verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss einer starken Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten der isolierten Kardiomyozyten

4.1.1 Versuchsaufbau

Die isolierten Kardiomyozyten wurden wie im Kapitel 3.1 beschrieben gewonnen. Die Hälfte der Zellen wurde dann, wie in 3.1 beschrieben, für 24 Stunden einer starken Hyperglykämie ausgesetzt. Die restlichen Zellen wurden als Kontrolle für die gleiche Zeit in normoglykämischem Kulturmedium inkubiert. Dann wurden die verschiedenen Parameter der Kardiomyozytenkontraktion im elektrischen Feld (siehe 3.2) gemessen.

4.1.2 Einfluss der Hyperglykämie auf die verschiedenen gemessenen Kontraktionsparameter

4.1.2.1 Einfluss der Hyperglykämie auf die Kontraktionsgeschwindigkeit

Untersucht wurde, welche Änderungen bei den Kontraktionsgeschwindigkeiten der Zellen unter starker Hyperglykämie gegenüber den Zellen in dem normoglykämischen Kontrollmedium auftraten. Ermittelt wurden dazu die Kontraktionsgeschwindigkeit und die time-to-peak.

Deutlich zeigen die Ergebnisse die Verlangsamung der Kontraktionsgeschwindigkeit der mit Glukose inkubierten Zellen bei 0,5 Hz. Lag diese bei den normoglykämischen Zellen bei $261 \pm 18,1 \mu\text{m/s}$, so reduzierte sie sich bei den Hyperglykämischen auf $205 \pm 7,8 \mu\text{m/s}$. Das entspricht einer Reduktion um ca. 20 %. Bei 1,0 Hz und 2,0 Hz bleibt die Kontraktionsgeschwindigkeit der Normoglykämischen und Hyperglykämischen Zellen ($167 \pm 8,4 \mu\text{m/s}$ und $169 \pm 5,6 \mu\text{m/s}$ bei 1 Hz und $133 \pm 6,5 \mu\text{m/s}$ und $134 \pm 4,4 \mu\text{m/s}$ bei 2 Hz) so gut wie gleich.

Die TTP verändert sich bei keiner Frequenz signifikant.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und 2 zusammengefasst und in Abbildung 1 graphisch veranschaulicht.

Tabelle 1: Kontraktionsgeschwindigkeit bei Hyperglykämie

Con-Vel ($\mu\text{m/s}$)	Normoglykämie	Hyperglykämie
0,5 Hz	$261 \pm 18,1 \mu\text{m/s}$	$*205 \pm 7,8 \mu\text{m/s}$
1,0 Hz	$167 \pm 8,4 \mu\text{m/s}$	$169 \pm 5,6 \mu\text{m/s}$
2,0 Hz	$133 \pm 6,5 \mu\text{m/s}$	$134 \pm 4,4 \mu\text{m/s}$

Tabelle 2: time-to-peak bei Hyperglykämie

TTP (ms)	Normoglykämie	Hyperglykämie
0,5 Hz	$86 \pm 3,3 \text{ ms}$	$91 \pm 3 \text{ ms}$
1,0 Hz	$81 \pm 2,8 \text{ ms}$	$83 \pm 2,1 \text{ ms}$
2,0 Hz	$80 \pm 3,2 \text{ ms}$	$84 \pm 2,9 \text{ ms}$

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

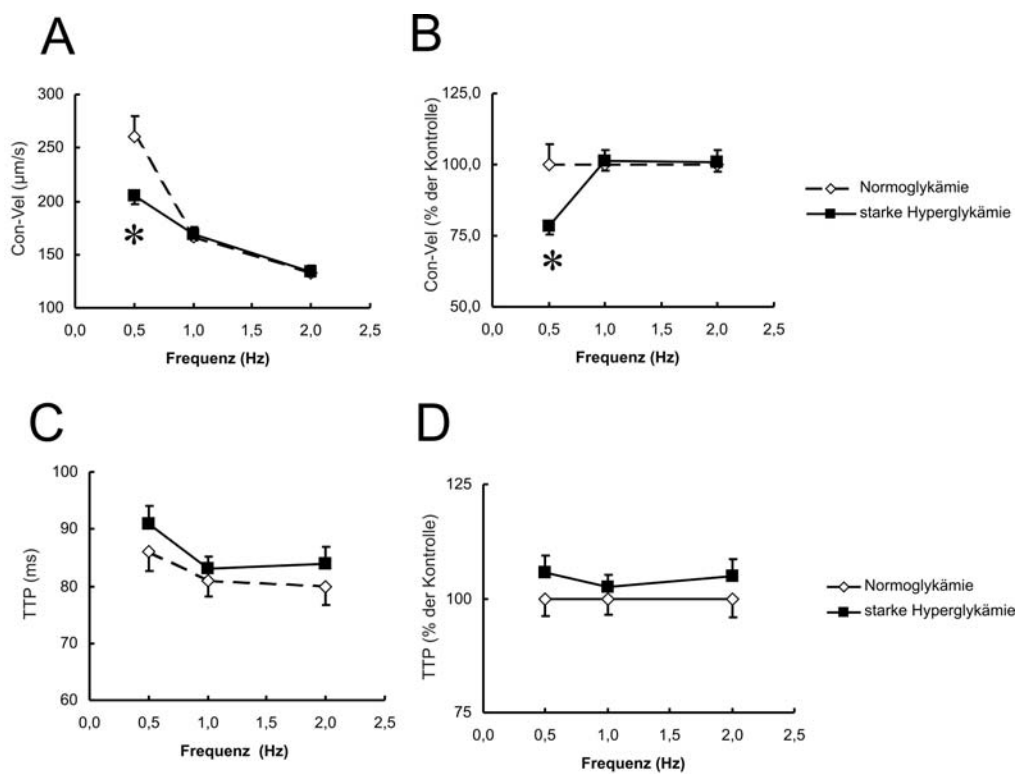


Abbildung 1: Einfluss einer starken Hyperglykämie auf die Verkürzungskinetik der Herzmuskelzellen. Dargestellt sind die Kontraktionsgeschwindigkeiten (Con-Vel) mit Mittelwert und Standardfehler für alle drei gemessenen Frequenzen (0,5 Hz 1,0 Hz 2,0 Hz) der mit 35 mmol/l Glukose über 24 Stunden inkubierten Proben (■) sowie der normoglykämischen Kontrollen (◇) in $\mu\text{m/s}$ (A) und als Prozent bezogen auf die Kontrollen (B). In (C) und (D) sind die zeitgleich erhobenen time-to-peak (TTP) Werte in Millisekunden (C) und ebenfalls als Prozent bezogen auf die Kontrollen (D) zu sehen. Gemessen wurden 84 Zellen unter Kontrollbedingungen und 105 Zellen bei Hyperglykämie. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.1.2.2 Einfluss der Hyperglykämie auf die Relaxationsgeschwindigkeit

Analog zu den in 4.1.2.1 untersuchten Veränderungen der Kontraktionsgeschwindigkeit wurden hier die Veränderungen in der Relaxationsgeschwindigkeit untersucht. Ermittelt wurden dazu die Relaxationsgeschwindigkeiten der Kardiomyozyten selbst in $\mu\text{m/s}$, sowie die R50 in Millisekunden.

((Rel-Vel, Tabelle 3 und Abbildung 2 A und B) Tabelle 4 und Abbildung 2 C und D).

Tabelle 3: Relaxationsgeschwindigkeit bei Hyperglykämie

Rel-Vel ($\mu\text{m/s}$)	Normoglykämie	Hyperglykämie
0,5Hz	$261 \pm 23,5 \mu\text{m/s}$	* $205 \pm 13,6 \mu\text{m/s}$
1,0Hz	$174 \pm 11,6 \mu\text{m/s}$	$161 \pm 6,8 \mu\text{m/s}$
2,0Hz	$148 \pm 11,7 \mu\text{m/s}$	$149 \pm 8 \mu\text{m/s}$

Tabelle 4: R50 bei Hyperglykämie

R50 (ms)	Normoglykämie	Hyperglykämie
0,5Hz	119 ± 3,3 ms	*135 ± 4,2 ms
1,0Hz	113 ± 3,4 ms	*128 ± 3,5 ms
2,0Hz	113 ± 4 ms	122 ± 3,8 ms

* p<0,05 vs. Kontrolle

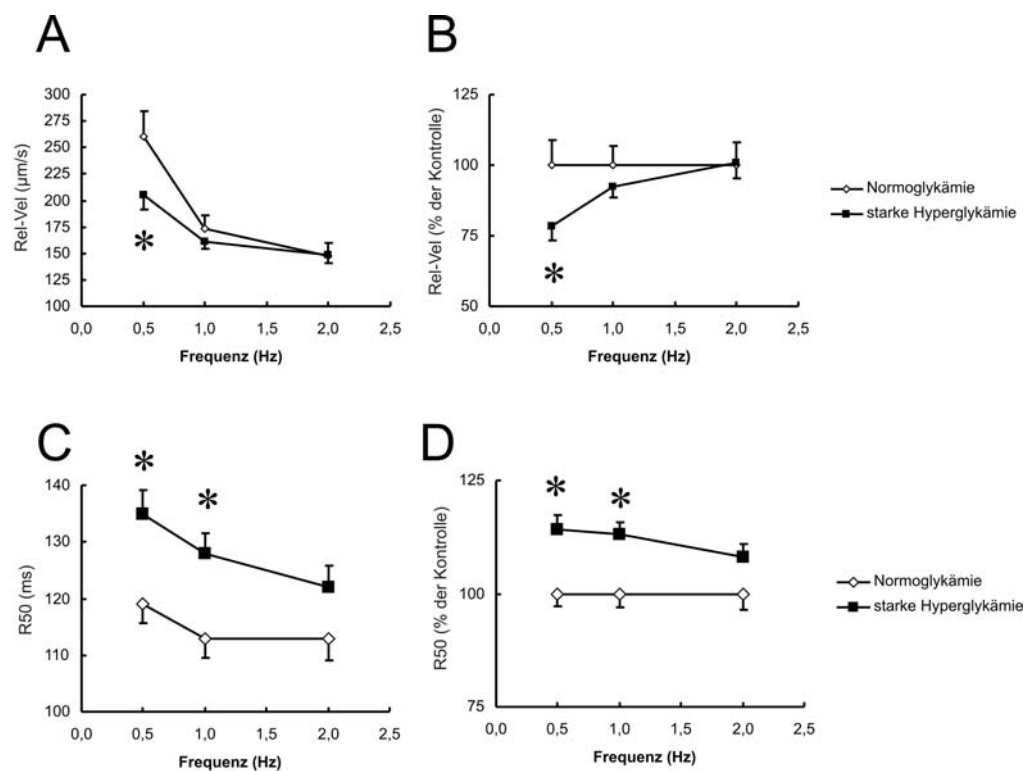


Abbildung 2: Einfluss einer starken Hyperglykämie auf die Verkürzungskinetik der Herzmuskelzellen. Dargestellt sind die Relaxationsgeschwindigkeiten mit Mittelwert und Standardfehler für alle drei gemessenen Frequenzen (0,5 Hz 1,0 Hz 2,0 Hz) der mit 35 mmol/l Glukose über 24 Stunden inkubierten Proben (■) sowie der Kontrollen (◇) in $\mu\text{m/s}$ (A) und als Prozent bezogen auf die Kontrollen (B). In Abb. C sind die Zeit, die die Zelle von maximaler Kontraktion bis zu einer Relaxation auf 50% der ursprünglichen diastolischen Länge (R50) benötigt, in Millisekunden angegeben und dies ebenfalls als Prozent, bezogen auf die Kontrollen zu sehen (D). Gemessen wurden 84 Zellen unter Kontrollbedingungen und 105 Zellen bei Hyperglykämie. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Auch bei der Relaxationsgeschwindigkeit zeigen sich nur bei 0,5 Hz signifikante Unterschiede. Hier verlangsamt sich die Relaxation von $261 \pm 23,5 \mu\text{m/s}$ bei den normoglykämischen Zellen auf $205 \pm 13,6 \mu\text{m/s}$ bei den einer starken Hyperglykämie ausgesetzten Zellen. Die Unterschiede werden bei höheren Frequenzen geringer und sind schon bei 1,0 Hz nicht mehr signifikant ($174 \pm 11,6 \mu\text{m/s}$ bei Normoglykämie und $161 \pm 6,8 \mu\text{m/s}$ bei Hyperglykämie).

Auch bei der R50 werden die Unterschiede bei höheren Frequenzen geringer, bleiben jedoch sowohl bei 0,5 Hz mit $119 \pm 3,3 \text{ ms}$ bei Normoglykämie und $135 \pm 4,2 \text{ ms}$ bei Hyperglykämie wie auch bei 1,0 Hz mit $113 \pm 3,4 \text{ ms}$ bei Normoglykämie und $128 \pm 3,5 \text{ ms}$ im signifikanten Bereich.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Hyperglykämie einen relevanten Einfluss auf das Relaxationsverhalten der Kardiomyozyten hat, sie relaxieren deutlich langsamer.

4.1.2.3 Einfluss der Hyperglykämie auf die relative Zellverkürzung

Untersucht wurde weiter der Einfluss einer starken Hyperglykämie auf die Zellverkürzung der Kardiomyozyten. Als Maß für die Zellverkürzung wurden die Zellverkürzung relativ zur diastolischen Zelllänge $\Delta L/L$ in Prozent (relative Zellverkürzung) gewählt. Ausserdem wurde die Dauer der maximalen Kontraktion als Differenz von R50 und T50TP in Millisekunden erhoben.

Hier zeigt sich eine signifikante Verstärkung der relativen Zellverkürzung bei 0,5 Hz von $8,27 \pm 0,28 \%$ bei den normoglykämischen Zellen auf $9,17 \pm 0,23 \%$

bei den einer Hyperglykämie ausgesetzten Zellen. Die Unterschiede bei 1,0 Hz und 2,0 Hz waren nicht signifikant.

Die Zeit der maximalen Kontraktion (FWHL) stieg von $84 \pm 3,2$ ms bei 0,5 Hz bei den normoglykämischen Kontrollen auf $96 \pm 3,1$ ms bei den hyperglykämischen Zellen an, bei 1,0 Hz von $76 \pm 2,5$ ms bei den normoglykämischen auf $88 \pm 2,7$ ms bei den hyperglykämischen Zellen. Bei 2,0 Hz waren wieder keine signifikanten Unterschiede zu erheben.

Die Ergebnisse sind in Tabell 5 und 6 sowie in Abbildung 3 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 5: relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ bei Hyperglykämie

$\Delta L/L$ (%)	Normoglykämie	Hyperglykämie
0,5Hz	$8,27 \pm 0,28$ %	* $9,17 \pm 0,23$ %
1,0Hz	$6,55 \pm 0,21$ %	$7,18 \pm 0,2$ %
2,0Hz	$5,64 \pm 0,29$ %	$5,83 \pm 0,26$ %

Tabelle 6: Zeit der maximalen Kontraktion (FWHL) bei Hyperglykämie

FWHL (ms)	Normoglykämie	Hyperglykämie
0,5Hz	$84 \pm 3,2$ ms	* $96 \pm 3,1$ ms
1,0Hz	$76 \pm 2,5$ ms	* $88 \pm 2,7$ ms
2,0Hz	$75 \pm 3,2$ ms	$77 \pm 2,5$ ms

* $p < 0,05$ v.s. Kontrolle

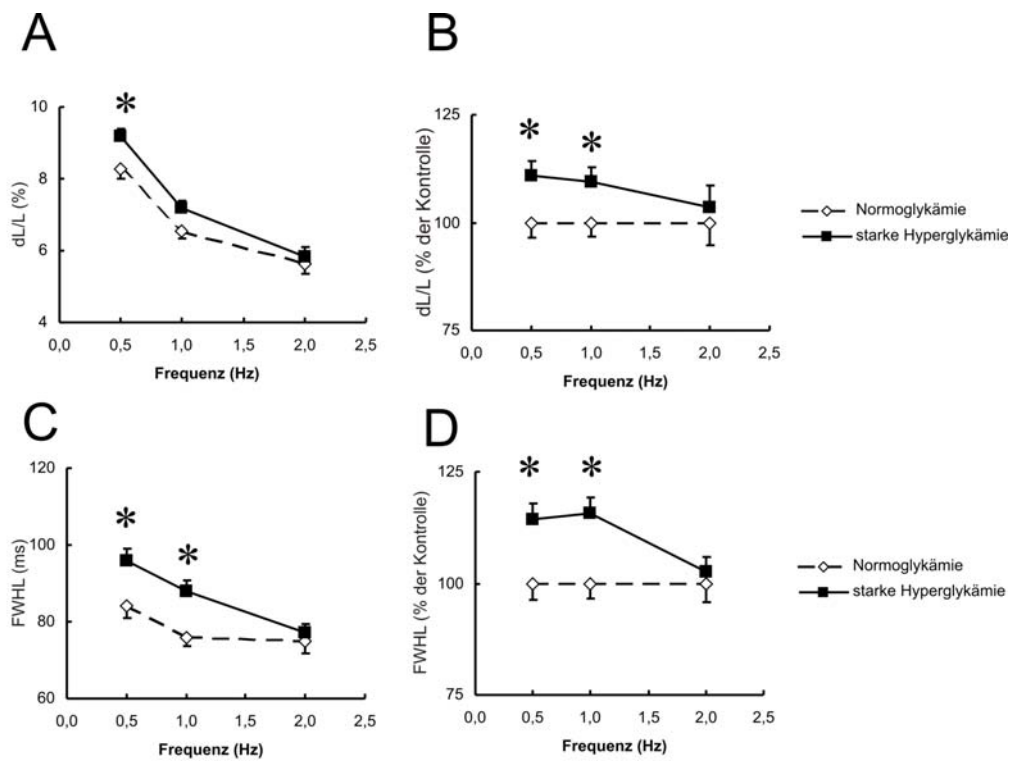


Abbildung 3: Einfluss der Hyperglykämie auf die Verkürzungskinetik der Herzmuskelzellen. Dargestellt sind die Differenz aus systolischer und diastolischer Zelllänge (ΔL) bezogen auf die diastolische Länge der Zelle ($\Delta L/L$) mit Mittelwert und Standardfehler für alle drei gemessenen Frequenzen (0,5 Hz 1,0 Hz 2,0 Hz) der mit 35 mmol/l Glukose über 24 Stunden inkubierten Proben (■) sowie der Kontrollen (◇) angegeben in Prozent der Zellverkürzung (A) und Prozent bezogen auf die Kontrollen (B). Als weiteres Maß für die Zellverkürzung sind die Differenz aus R50 – T50TP in Millisekunden (FWHL) (C) und als Prozent bezogen auf die Kontrolle zu sehen (D), um die Unterschiede in der Zeit größter Kontraktion darzustellen. Gemessen wurden 84 Zellen unter Kontrollbedingungen und 105 Zellen bei Hyperglykämie. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Die dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass sowohl die Zellverkürzung wie auch die Dauer der maximalen Kontraktion (FWHL) durch die Hyperglykämie verlängert werden. Im erstenen Fall gibt es wieder nur bei 0,5 Hz signifikante Unterschiede, bei der FWHL bei 0,5 Hz und 1,0 Hz.

4.2 Einfluss von Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten isolierter Kardiomyozyten unter Last

4.2.1 Versuchsaufbau

Die Kardiomyozyten wurden wie in Kapitel 3.1 gewonnen und inkubiert. Dann wurde ein Teil der Zellen für 24 Stunden einer moderaten Hyperglykämie ausgesetzt, die andere Hälfte normoglykämischen Bedingungen. In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Kardiomyozyten wieder unter stark hyperglykämischen Bedingungen inkubiert.

Direkt vor den Messungen wurde die zu messende Kulturschale aus dem Brutschrank genommen. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und durch ein anderes mit höherer Viskosität (400cP) ersetzt. Die Viskositätserhöhung war durch den Zusatz von Methylzellulose erreicht worden. Damit wird eine erhöhte externe Last imitiert, was einer erhöhten Nachlast im Gesamtorgan entspricht. Das 400cP-Medium wurde vor Gebrauch auf 37° Celsius erwärmt.

Nun wurden die Zellen wie schon unter 4.1 beschrieben im elektrischen Feld stimuliert und die Kontraktionsparameter gemessen.

4.2.2 Einfluss einer moderaten Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten von Kardiomyozyten unter Last

Die erste Versuchsreihe wurde mit einer moderaten Hyperglykämie durchgeführt.

Als Maß für die Zellverkürzung wurde die prozentuale Verkürzung der Zelle bezogen auf die diastolische Zelllänge ($\Delta L/L$) benutzt.

Diese relative Zellverkürzung verstärkte sich bei 0,5 Hz von $7,93 \pm 0,25\%$ bei den normoglykämischen Zellen auf $9,32 \pm 0,20\%$ bei denen, die einer moderaten Hyperglykämie ausgesetzt waren, bei 1,0 Hz von $6,53 \pm 0,22\%$ auf $8,37 \pm 0,20\%$ und bei 2 Hz von $6,74 \pm 0,24\%$ auf $8,21 \pm 0,21\%$.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt und in Abbildung 4 graphisch veranschaulicht.

Tabelle 7: relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ unter Last bei moderater Hyperglykämie

$\Delta L/L$ (%)	Normoglykämie	moderate Hyperglykämie
0,5Hz	$7,93 \pm 0,25\%$	* $9,32 \pm 0,20\%$
1,0Hz	$6,53 \pm 0,22\%$	* $8,37 \pm 0,20\%$
2,0Hz	$6,74 \pm 0,24\%$	* $8,21 \pm 0,21\%$

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

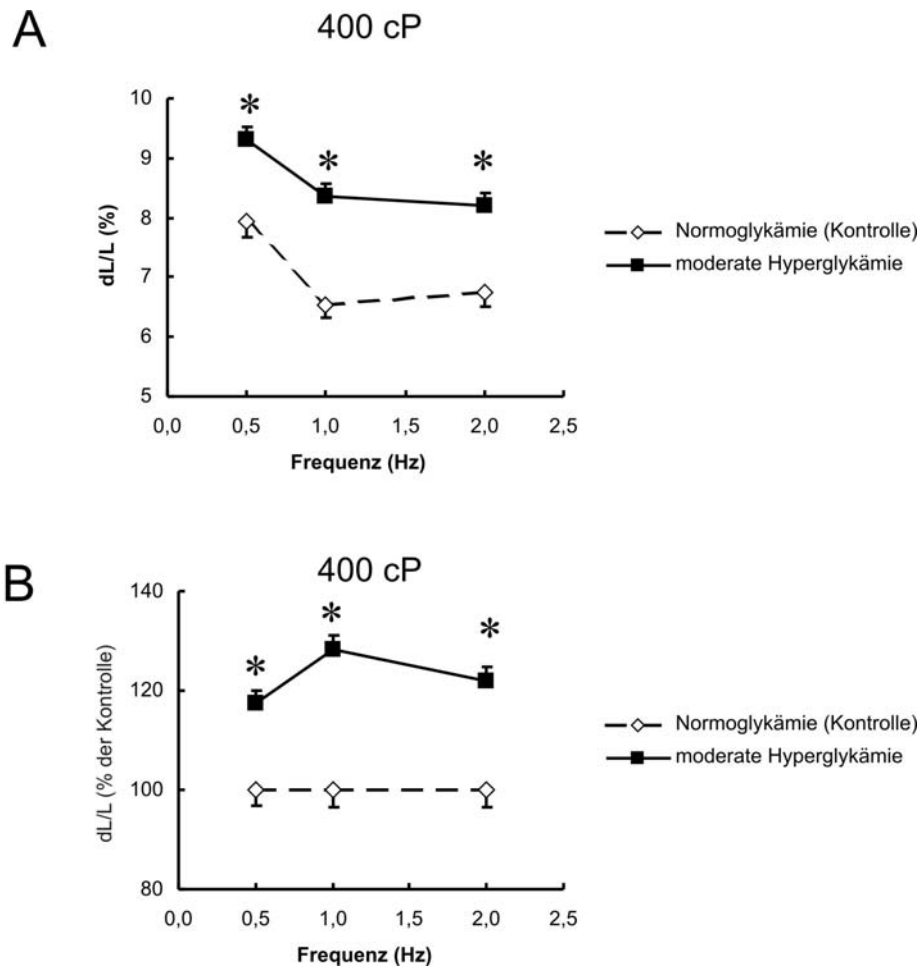


Abbildung 4: Einfluss einer moderaten Hyperglykämie auf die Verkürzungskinetik der Kardiomyozyten im viskösen Medium. Die erhöhte Viskosität entsprach 400 cP und wurde durch den Zusatz von Methylzellulose erreicht. Simuliert wurde damit eine erhöhte Nachlast im gesamten Organ. Die Hälfte der Zellen wurde für 24 Stunden mit 15 mmol/l Glukose (■)(moderate Hyperglykämie), die andere Hälfte als Kontrolle ohne weitere Zusätze in normoglykämischem Kulturmedium (◇) als Kontrollen inkubiert. Als Maß für die Zellverkürzung ist hier die relative Zellverkürzung in Prozent $\Delta L/L$, bezogen auf die diastolische Zelllänge dargestellt (A) sowie der selbe Wert als Prozent bezogen auf die Kontrollen (B). Gemessen wurden bei den Frequenzen 0,5 Hz, 1,0 Hz und 2,0 Hz jeweils 66 Zellen bei Hyperglykämie und Normoglykämie als Kontrolle. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

Bei allen gemessenen Frequenzen ist die relative Zellverkürzung der einer moderaten Hyperglykämie ausgesetzten Zellen also signifikant höher. Eine für kurze Zeit einwirkende (< 24 h), moderate Hyperglykämie hat eine positive Wirkung auf die relative Zellverkürzung.

4.2.3 Einfluss einer starken Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten unter Last

In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Kardiomyozyten für 24 Stunden einer starken Hyperglykämie ausgesetzt und mit normoglykämischen Kontrollen unter Last verglichen.

Wieder wurde die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ als Maß für die Zellverkürzung genommen.

Hier verringerte sich die relative Zellverkürzung bei 0,5 Hz von $11,9 \pm 0,26\%$ auf $10,14 \pm 0,31\%$ und bei 1,0 Hz, weniger deutlich, aber noch signifikant, von $10,85 \pm 0,21\%$ auf $10,14 \pm 0,31\%$. Bei 2 Hz waren keine signifikanten Unterschiede mehr zu erheben.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt und in Abbildung 5 graphisch veranschaulicht.

Tabelle 8: relative Zellverkürzung unter Last bei starker Hyperglykämie

35 mmol/l Glukose, $\Delta L/L$	Normoglykämie	Starke Hyperglykämie
0,5Hz	$11,9 \pm 0,26 \%$	* $10,14 \pm 0,31 \%$
1,0Hz	$10,85 \pm 0,21 \%$	* $9,82 \pm 0,25 \%$
2,0Hz	$10,88 \pm 0,27 \%$	$10,49 \pm 0,23 \%$

* $p < 0,05$ vs Kontrolle

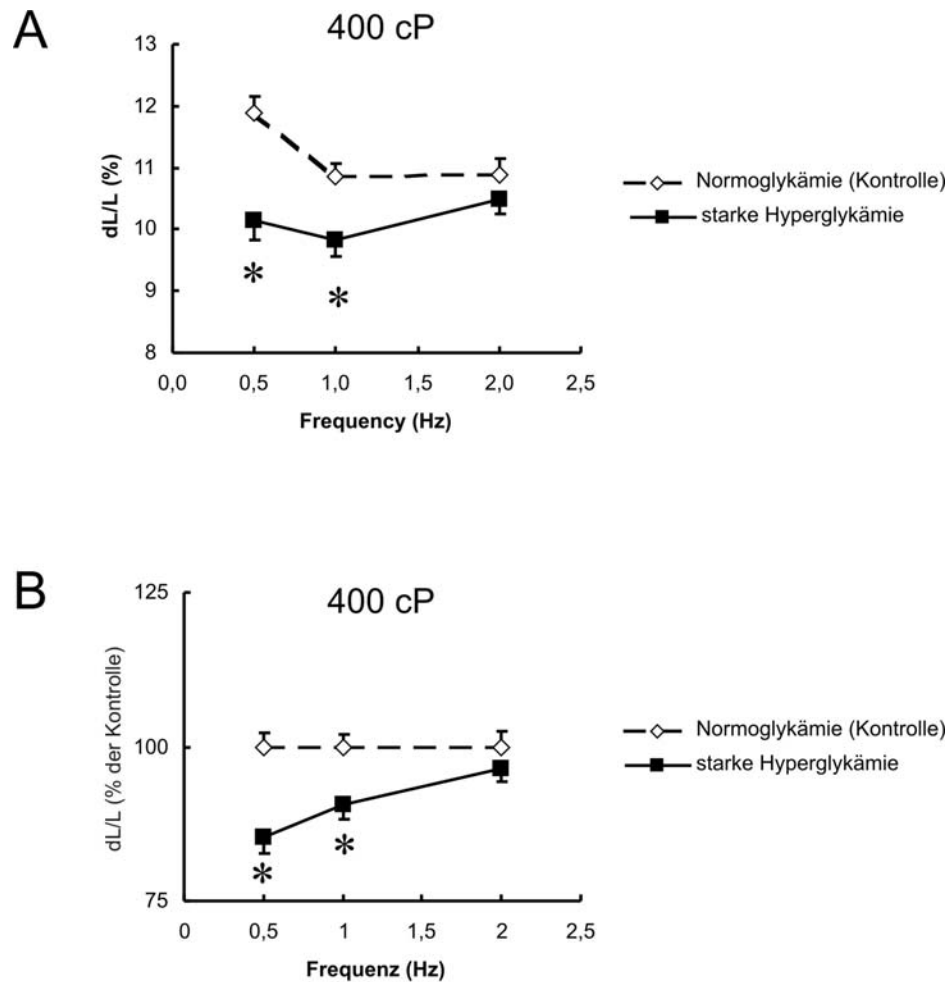


Abbildung 5: Einfluss einer starken Hyperglykämie auf die Kontraktionskinetik der Kardiomyozyten im viskösen Medium. Die erhöhte Viskosität wurde durch den Zusatz von Methylzellulose erreicht, entsprach 400 cP und simuliert eine erhöhte Nachlast im Gesamtorgan. Die Hälfte der Zellen wurde für 24 Stunden einer starken Hyperglykämie ausgesetzt (■), die andere Hälfte als Kontrolle ohne weitere Zusätze (◇) inkubiert und anschließend im elektrischen Feld gemessen. Als Maß für die Kontraktilität ist hier die relative Zellverkürzung in Prozent $\Delta L/L$, bezogen auf die diastolische Zelllänge dargestellt (A) sowie der selbe Wert als Prozent bezogen auf die Kontrollen (B). Gemessen wurden jeweils 66 Zellen bei den Frequenzen 0,5 Hz, 1,0 Hz und 2,0 Hz. Signifikante ($p < 0,05$ vs Kontrolle) Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

Werden die Zellen also einer starken Hyperglykämie ausgesetzt, verringert sich im Gegensatz zu den einer moderaten Hyperglykämie ausgesetzten Zellen die relative Zellverkürzung.

Der Einfluss der Glukose ist konzentrationsabhängig.

4.3 Einfluss der extrazellulären Kalziumkonzentration auf das Kontraktionsverhalten der isolierten Herzmuskelzellen unter starker Hyperglykämie

4.3.1 Versuchsaufbau

Die isolierten Kardiomyozyten wurden wie im Kapitel 3.1 beschrieben gewonnen. Die Hälfte der Zellen wurde dann, wie in 3.1.2 beschrieben, für 24 Stunden einer starken Hyperglykämie ausgesetzt. Die restlichen Zellen wurden als Kontrolle für die gleiche Zeit in normoglykämischem Kulturmedium inkubiert. Mit beiden Zellgruppen wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit drei verschiedenen Kalziumkonzentrationen von 0,5 mmol/l, 1,0 mmol/l und 2,0 mmol/l erstellt.

Zehn Minuten vor Beginn der Messungen wurde das Medium aus der zu messenden Schale entfernt und durch einen Zellkontraktionspuffer mit einer der genannten Kalziumkonzentrationen ersetzt. Dieser war zuvor auf 37° Celsius erwärmt worden. Nach Austausch der Medien wurde die Schale bis zur Messung wieder im Brutschrank gelagert und anschliessend wie unter 3.2 beschrieben im elektrischen Feld gemessen.

4.3.2 Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten bei starker Hyperglykämie bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen

Die relative Zellverkürzung verstärkte sich mit zunehmender Medium-Kalziumkonzentration bei den normoglykämischen Zellen von $3,13 \pm 0,19\%$ bei 0,5 mmol/l auf $5,64 \pm 0,4\%$ bei 1,0 mmol/l und $9,74 \pm 0,31\%$ bei 2,0 mmol/l. Bei den einer starken Hyperglykämie ausgesetzten Zellen verstärkte sie sich von $3,76 \pm 0,38\%$ bei 0,5 mmol/l auf $5,83 \pm 0,4\%$ bei 1,0 mmol/l und auf $8,93 \pm 0,36\%$ bei 2,0 mmol/l.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Steigerungen der normoglykämischen und den hyperglykämischen Zellen zeigte sich nicht.

Die Kontraktionsgeschwindigkeit nahm ebenfalls mit zunehmender Medium-Kalziumkonzentration zu, und zwar bei den normoglykämischen Kontrollen von $76 \pm 3,1 \mu\text{m/s}$ bei $0,5 \text{ mmol/l}$ auf $133 \pm 8,9 \mu\text{m/s}$ bei $1,0 \text{ mmol/l}$ und $216 \pm 14 \mu\text{m/s}$ bei $2,0 \text{ mmol/l}$.

Bei den hyperglykämischen Zellen war der Anstieg von $77 \pm 3,3 \mu\text{m/s}$ bei $0,5 \text{ mmol/l}$ auf $134 \pm 6,7 \mu\text{m/s}$ bei $1,0 \text{ mmol/l}$ fast gleich dem bei den normoglykämischen Kontrollen. Der zu beobachtende Anstieg der Kontraktionsgeschwindigkeit bei $2,0 \text{ mmol/l}$ auf $169 \pm 8,5\%$ blieb jedoch deutlich signifikant hinter dem der normoglykämischen Zellen zurück.

Für die hier nicht graphisch aufgeführte Relaxationsgeschwindigkeit gab es hingegen keine Unterschiede.

Die erhobenen Ergebnisse sind in Tabelle 9 und 10 zusammengefasst und in Abbildung 6 graphisch veranschaulicht.

Tabelle 9: relative Zellverkürzung ($\Delta L/L$) bei Hyperglykämie und verschiedenen Kalziumkonzentrationen

$\Delta L/L$ bei 2Hz	Normoglykämie	Hyperglykämie
$0,5 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$	$3,13 \pm 0,19 \%$	$3,76 \pm 0,38 \%$
$1,0 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$	$5,64 \pm 0,4 \%$	$5,83 \pm 0,4 \%$
$2,0 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$	$9,74 \pm 0,31 \%$	$8,93 \pm 0,36 \%$

Tabelle 10: Kontraktionsgeschwindigkeit (Con-Vel) bei Hyperglykämie und verschiedenen Kalziumkonzentrationen

Con-Vel bei 2Hz	Normoglykämie	Hyperglykämie
$0,5 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$	$76 \pm 3,1 \mu\text{m/s}$	$77 \pm 3,3 \mu\text{m/s}$
$1,0 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$	$133 \pm 8,9 \mu\text{m/s}$	$134 \pm 6,7 \mu\text{m/s}$
$2,0 \text{ mmol/l Ca}^{2+}$	$216 \pm 14 \mu\text{m/s}$	$*169 \pm 8,5 \mu\text{m/s}$

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle

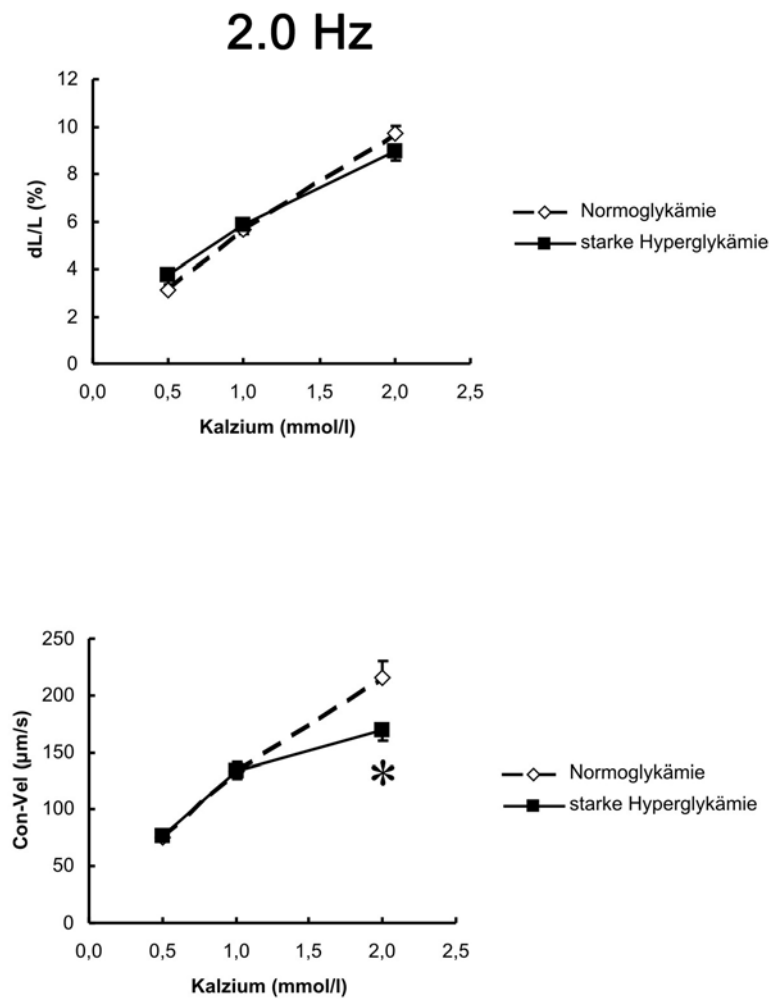


Abbildung 6: Einfluss der Hyperglykämie auf die Ansprechbarkeit der Herzmuskelzellen auf Kalzium. Dargestellt sind relative Zellverkürzung in Prozent $\Delta L/L$, sowie die Kontraktionsgeschwindigkeit Con-Vel in Millisekunden der für 24 Stunden mit 35 mmol/l Glukose inkubierten Zellen (\blacksquare) und der normoglykämischen Kontrollen (\diamond). Auf den x-Achsen sind die verschiedenen Medium-Kalziumkonzentrationen in mmol/l aufgetragen. Die Messungen wurden bei 2 Hz durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. Gemessen wurden bei allen Kalziumkonzentrationen 45 Zellen unter Hyperglykämie und 45 Zellen als normoglykämische Kontrollen. *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

4.4 Einfluss einer starken Hyperglykämie auf die β -adrenerge Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten

4.4.1 Versuchsaufbau

Die Zellen wurden wie unter 3.1 beschrieben gewonnen und wieder zur Hälfte für 24 Stunden einer starken Hyperglykämie ausgesetzt, die andere Hälfte wurde unter normoglykämischen Bedingungen inkubiert.

Unmittelbar vor den Messungen wurde den Proben Isoprenalin zugegeben, so dass die Isoprenalinkonzentration im Medium 0,1 nmol/l, 1 nmol/l, 10 nmol/l bzw. 100 nmol/l betrug. Dann wurden die Kontraktionsparameter der Zellen im elektrischen Feld gemessen.

4.4.2 Kontraktionsverhalten der Kardiomyozyten unter Hyperglykämie bei verschiedenen Isoprenalin-Konzentrationen

Die mit Glukose inkubierten Zellen zeigten bei einer Isoprenalinkonzentration von 0,1 nmol/l und einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz eine relative Zellverkürzung von $6,13 \pm 0,44\%$, die normoglykämischen Zellen von $5,09 \pm 0,23\%$, der Unterschied war nicht signifikant. Bei einer Erhöhung der Isoprenalinkonzentration von 0,1 nmol/l auf 1 nmol/l war die Verstärkung der relativen Zellverkürzung der hyperglykämischen Zellen um $31 \pm 3,7\%$ auf $8,02 \pm 0,24\%$ geringer als die Verstärkung der normoglykämischen Zellen um $64 \pm 5,0\%$ auf $8,36 \pm 0,24\%$. Bei einer Isoprenalinkonzentration von 10 nmol/l verstärkte sich die relative Zellverkürzung bei den normoglykämischen Zellen um $113 \pm 4,5\%$ gegenüber den bei 0,1 nmol/l erhobenen Werten auf $10,84 \pm 0,23\%$. Bei den der Hyperglykämie ausgesetzten Zellen war lediglich eine Verstärkung um $74 \pm 5,0\%$ auf $10,69 \pm 0,28\%$ zu verzeichnen.

Diese Unterschiede sind signifikant, eine Hyperglykämie hat einen Einfluss auf die β -adrenerge Ansprechbarkeit der Kardiomyozyten, die Ansprechbarkeit auf

Katecholamine ist bei einer starken Hyperglykämie ausgesetzten Herzmuskelzellen geringer.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst und in Abbildung 7 graphisch veranschaulicht.

Tabelle 10: relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ und prozentual Steigerung der relativen Zellverkürzung gegenüber dem Ausgangswert (0,1 nmol/l) bei Normoglykämie und Hyperglykämie und steigender Isoprenalinexposition bei 2 Hz

$\Delta L/L$ bei Isoprenalinexposition 2 Hz	Normoglykämie	Hyperglykämie
0,1 nmol/l		
- Total	$5,09 \pm 0,23 \%$	$6,13 \pm 0,44 \%$
- Prozentual	100 %	100 %
1 nmol/l		
- Total	$8,36 \pm 0,24 \%$	$8,02 \pm 0,24 \%$
- Prozentual	$164 \pm 5,0 \%$	$*131 \pm 3,7 \%$
10 nmol/l		
- Total	$10,84 \pm 0,23 \%$	$10,69 \pm 0,28 \%$
- Prozentual	$213 \pm 4,5 \%$	$*174 \pm 5,0 \%$
100 nmol/l		
- Total	$11,77 \pm 0,49 \%$	$13,06 \pm 0,65 \%$
- Prozentual	$231 \pm 9,9 \%$	$213 \pm 10,7 \%$

*: $p < 0,05$ vs. Normoglykämie

2.0 Hz

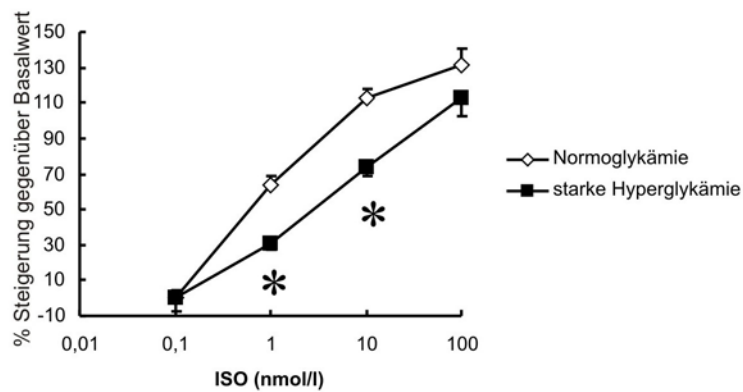
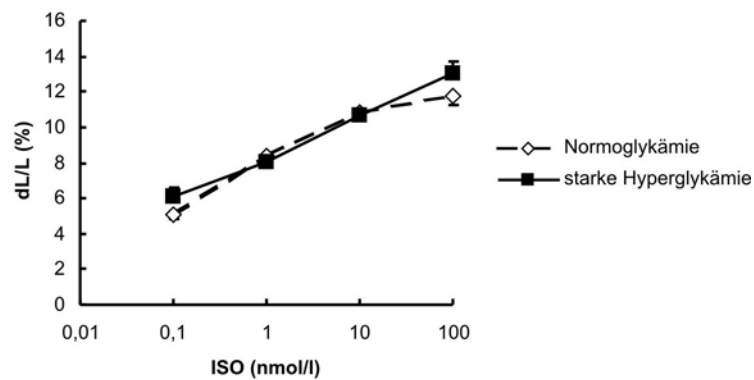


Abbildung 7: Einfluss der Hyperglykämie auf die Ansprechbarkeit auf Isoprenalin (β -adrenerge Ansprechbarkeit) bei verschiedenen Isoprenalinkonzentrationen der für 24 Stunden mit Glukose inkubierten Kardiomyozyten (■) und der ohne Glukosezusatz inkubierten Kontrollen (◇). Dargestellt ist als Maß für die Kontraktilität die relative Zellverkürzung bezogen auf die diastolische Zelllänge $\Delta L/L$ in Prozent (A), sowie die prozentuale Steigerung bezogen auf die bei 0,1 nmol/l Isoprenalin erhobenen Werte (B) bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. Signifikante Unterschiede sind mit * gekennzeichnet.

4.5 Einfluss verschiedener TIP39 Konzentrationen auf das Kontraktionsverhalten der isolierten Kardiomyozyten

4.5.1 Versuchsaufbau

Die Kardiomyozyten wurden wie in 3.1 beschrieben gewonnen.

In einer ersten Serie wurden die Zellen vor der Messung wie folgt behandelt:

1. L-NA (5 mmol/l)
2. TIP39
3. L-NA + TIP39

Eine 4. Gruppe von Zellen wurde wiederum 24 Stunden einer starken Hyperglykämie ausgesetzt und anschließend TIP39 zugegeben.

Die Messungen wurden jeweils mit 0,01 nmol/l, 0,1 nmol/l, 1 nmol/l, 10 nmol/l sowie 100 nmol/l TIP39 bei 2 Hz durchgeführt.

Eine zweite Serie wurde mit konstant 100 nmol/l TIP39 bei verschiedenen Frequenzen durchgeführt.

4.5.2 Einfluss verschiedener TIP39 Konzentrationen auf die Kontraktionseigenschaften der Kardiomyozyten bei Normoglykämie und starker Hyperglykämie

Die Versuche wurden wie oben beschrieben mit steigenden Konzentrationen TIP39 durchgeführt.

Bis zu einer Konzentration von 1 nmol/l TIP39 waren im Vergleich zu den bei 0,01 nmol/l erhobenen Werten keine signifikanten Unterschiede zu finden. Bei den mit L-NA behandelten Zellen kam es jedoch ab einer TIP39 Konzentration von 1 nmol/l zu einer signifikanten Reduktion der relativen Zellverkürzung auf $75,6 \pm 3,6\%$ sowie der Kontraktionsgeschwindigkeit auf $74,8 \pm 5,6\%$. Die Relaxationsgeschwindigkeit verringerte sich sogar auf $70,7 \pm 5,5\%$ des Ausgangswertes.

Bei weiter steigender TIP39 Konzentration verlangsamten sich die Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit weiter (auf $69,6 \pm 5,8\%$ des Ausgangswertes bei 10 nmol/l und $58,7 \pm 2,4\%$ bei 100 nmol/l bzw. $68 \pm 6,5\%$ bei 10 nmol/l und $66,5 \pm 4,5\%$ bei 100 nmol/l), die relative Zellverkürzung stieg nach einer Verringerung auf $66 \pm 3,7\%$ des Ausgangswertes bei 10 nmol/l bei einer TIP39 Konzentration von 100 nmol/l wieder auf $82,6 \pm 4,0\%$ an.

Bei den einer starken Hyperglykämie ausgesetzten Zellen und den Normoglykämischen Kontrollen kam es bei keiner TIP39 Konzentration zu signifikanten Veränderungen.

Die Werte sind in den Tabellen 12, 13 und 14 aufgeführt und in Abbildung 8 graphisch veranschaulicht.

Tabelle 11: Veränderungen in der relativen Zellverkürzung $\Delta L/L$ der Kardiomyozyten in Prozent bei verschiedenen TIP39 Konzentrationen:

TIP39, $\Delta L/L$	Normoglykämie	L-NA	Hyperglykämie
0,01 nmol/l	$100,0 \pm 3,6 \%$	$100,0 \pm 4,5 \%$	$100,0 \pm 5,0 \%$
0,1 nmol/l	$93,4 \pm 4,2 \%$	$104,4 \pm 6,7 \%$	$114,6 \pm 4,9 \%$
1 nmol/l	$86,5 \pm 3,0 \%$	$*75,6 \pm 3,6 \%$	$109,6 \pm 3,6 \%$
10 nmol/l	$93,8 \pm 3,4 \%$	$*66 \pm 3,7 \%$	$104,6 \pm 3,7 \%$
100 nmol/l	$107,6 \pm 3,0 \%$	$82,6 \pm 4,0 \%$	$103,0 \pm 3,8 \%$

Tabelle 12: Veränderungen der Kontraktionsgeschwindigkeit Con-Vel der Kardiomyozyten bei verschiedenen TIP39 Konzentrationen:

TIP39, Con-Vel	Normoglykämie	L-NA	Hyperglykämie
0,01 nmol/l	$100,0 \pm 5,6 \%$	$100,0 \pm 7,6 \%$	$100,0 \pm 9,8 \%$
0,1 nmol/l	$88,1 \pm 4,2 \%$	$121,0 \pm 8,7 \%$	$83,1 \pm 5,1 \%$
1 nmol/l	$93,2 \pm 3,8 \%$	$*75,8 \pm 5,6 \%$	$73,6 \pm 2,5 \%$
10 nmol/l	$83,6 \pm 4,4 \%$	$*69,6 \pm 5,8 \%$	$97,5 \pm 6,4 \%$
100 nmol/l	$105,9 \pm 7,7 \%$	$*58,7 \pm 2,4 \%$	$90,9 \pm 5,2 \%$

Tabelle 13: Veränderungen der Relaxationsgeschwindigkeit Rel-Vel der Kardiomyozyten bei verschiedenen TIP39 Konzentrationen:

TIP39, RelVel	Normoglykämie	L-NA	Hyperglykämie
0,01 nmol/l	100,0 ± 6,6 %	100,0 ± 7,9 %	100,0 ± 15,1 %
0,1 nmol/l	78,1 ± 4,8 %	114,4 ± 18,3 %	79,3 ± 8,4 %
1 nmol/l	93,0 ± 3,5 %	*70,8 ± 5,5 %	76,5 ± 4,6 %
10 nmol/l	80,2 ± 7,1 %	*68,0 ± 6,5 %	94,2 ± 8,5 %
100 nmol/l	109,6 ± 12,0 %	*66,5 ± 4,5 %	103,1 ± 9,9 %

*: p<0,05 vs. Kontrolle

2 Hz

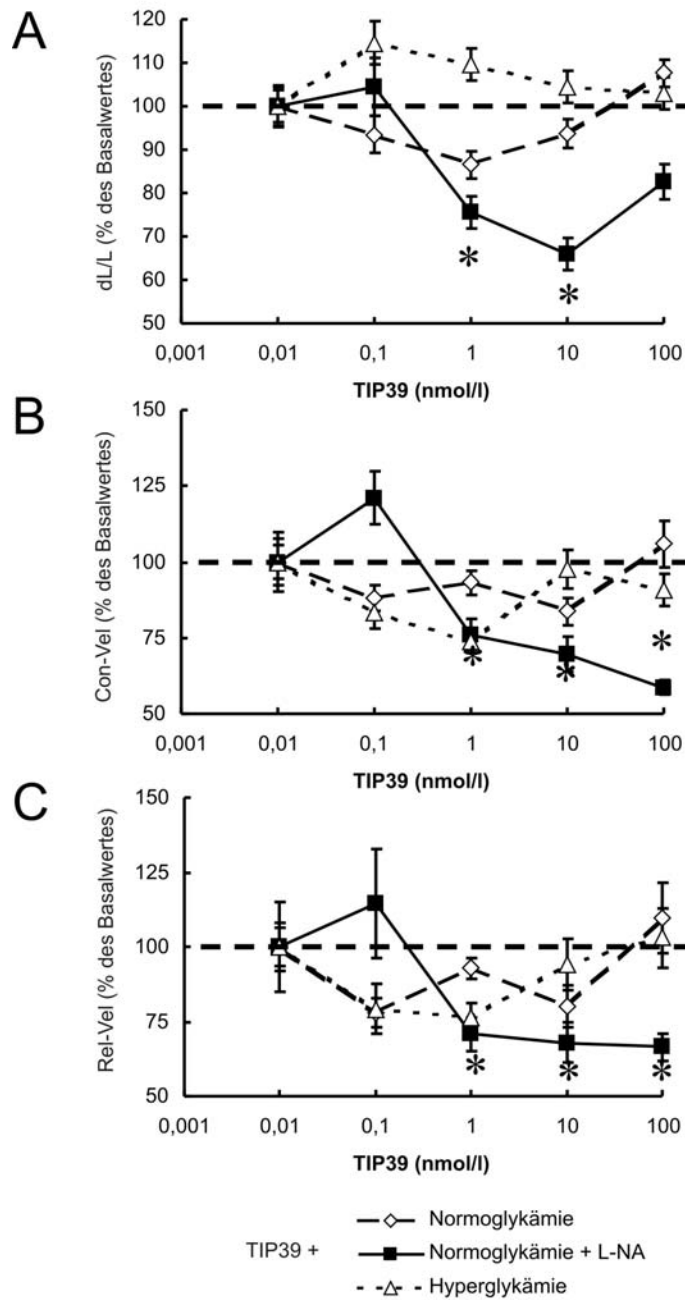


Abbildung 8: Einfluss verschiedener TIP39 Konzentrationen auf die Kontraktionskinetik der Kardiomyozyten. Dargestellt sind relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ (A), Kontraktionsgeschwindigkeit Con-Vel (B) und Relaxationsgeschwindigkeit Rel-Vel (C) als jeweilige prozentuale Veränderung bezogen auf den bei niedrigster TIP39 Konzentration erhobenen Wert (0,01 nmol/l) bei einer Stimulationsfrequenz von 2 Hz für Zellen bei Normoglykämie (◇), die 5 mmol/l L-NA ausgesetzten Zellen (■) und die für 24 Stunden mit 35 mmol/l Glukose inkubierten Zellen (△). Gemessen wurden 54 nicht vorbehandelte Zellen, 63 mit L-NA behandelte Zellen und 30 einer Hyperglykämie ausgesetzte Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. *: $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

TIP39 hat nur unter Anwesenheit von L-NA ab einer TIP39-Konzentration von 1 nmol/l einen signifikant-negativen Effekt auf die Parameter relative Zellverkürzung, Kontraktionsgeschwindigkeit und Relaxationsgeschwindigkeit. Bei niedrigeren Konzentrationen tritt zunächst sogar ein tendenzieller, aber nicht signifikanter, positiver Effekt auf.

4.5.3 Einfluss von TIP39 auf die Kontraktionseigenschaften der Kardiomyozyten bei verschiedenen Kontraktionsfrequenzen

Die Versuche wurden wie oben beschrieben mit einer Konzentration von 100 nmol/l TIP39 bei Stimulationsfrequenzen von 0,5 Hz, 1 Hz und 2 Hz durchgeführt. Verglichen wurden die Messwerte mit denen unbehandelter Zellen.

Bei den nur mit TIP39 behandelten Zellen zeigte kein gemessener Parameter signifikante Abweichungen von denen unbehandelter Zellen.

Auch bei den einer starken Hyperglykämie und TIP39 ausgesetzten Kardiomyozyten fanden sich keine relevanten Unterschiede.

Bei den Zellen, welche mit TIP39 und L-NA behandelt worden waren, verringerte sich die relative Zellverkürzung bei 0,5 Hz auf $93,7 \pm 3,5\%$, bei 1,0 Hz auf $84,6 \pm 3,2\%$ und bei 2,0 Hz auf $82,6 \pm 4,0\%$ der bei unbehandelten Kontrollen gemessenen Werte.

Die Kontraktionsgeschwindigkeit verringerte sich bei den so behandelten Zellen auf $74,5 \pm 2,0\%$ bei 0,5 Hz, auf $67,1 \pm 2,1\%$ bei 1,0 Hz und auf $58,7 \pm 1,7\%$ bei 2 Hz gegenüber den Kontrollen.

Auch zeigt sich eine deutliche Reduktion der Relaxationsgeschwindigkeit auf $81,9 \pm 2,9\%$ bei 0,5 Hz, $78,8 \pm 3,1\%$ bei 1,0 Hz und $66,5 \pm 3,3\%$ bei 2 Hz.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 15, 16 und 17 aufgeführt und in Abbildung 9 graphisch veranschaulicht.

Tabelle 14: Veränderungen in der relativen Zellverkürzung $\Delta L/L$ der Kardiomyozyten in Prozent gegenüber unbehandelten Kontrollen.

Stimulationsfrequenz, $\Delta L/L$	TIP39 (100 nmol/l)	L-NA + TIP39	Hyperglykämie + TIP39
0,5Hz	106,0 \pm 2,8 %	*93,7 \pm 3,5 %	108,5 \pm 4,0 %
1,0Hz	99,6 \pm 2,0 %	*84,6 \pm 3,2 %	102,3 \pm 3,6 %
2,0Hz	107,6 \pm 2,1 %	*82,6 \pm 4,0 %	103,0 \pm 3,8 %

Tabelle 15: Veränderungen in der Kontraktionsgeschwindigkeit Con-Vel der Kardiomyozyten in Prozent gegenüber unbehandelten Kontrollen.

Stimulationsfrequenz, Con-Vel	TIP39 (100 nmol/l)	L-NA + TIP39	Hyperglykämie + TIP39
0,5Hz	93,9 \pm 4,1 %	*74,5 \pm 2,0 %	98,7 \pm 4,5 %
1,0Hz	89,7 \pm 4,0 %	*67,1 \pm 2,1 %	89,8 \pm 3,6 %
2,0Hz	105,9 \pm 7,7 %	*58,7 \pm 1,7 %	90,9 \pm 4,8 %

Tabelle 16: Veränderungen in der Relaxationsgeschwindigkeit Rel-Vel der Kardiomyozyten in Prozent gegenüber unbehandelten Kontrollen.

Stimulationsfrequenz, Rel-Vel	TIP39 (100 nmol/l)	L-NA + TIP39	Hyperglykämie + TIP39
0,5Hz	105,7 \pm 10,1	*81,9 \pm 2,9	80,4 \pm 6,6
1,0Hz	93,1 \pm 5,1	*78,8 \pm 3,1	104,0 \pm 5,7
2,0Hz	109,6 \pm 12,0	*66,5 \pm 3,3	103,1 \pm 9,9

* p<0,05 vs. Kontrolle

TIP39 (100 nmol/l)

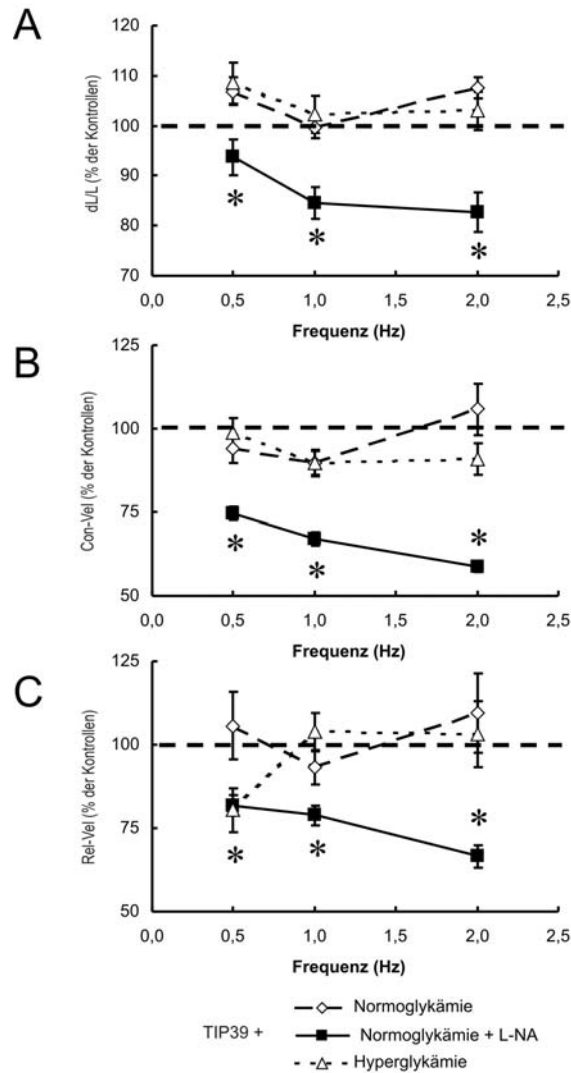


Abbildung 9: Einfluss von 100 nmol/l TIP39 auf die relative Zellverkürzung $\Delta L/L$ (A), Kontraktionsgeschwindigkeit Con-Vel (B) und Relaxationsgeschwindigkeit Rel-Vel (C) bei 0,5 Hz, 1,0 Hz und 2,0 Hz Stimulationsfrequenz als Prozentuale Veränderung bezogen auf nicht mit TIP39 behandelte, normoglykämische Kontrollen. Dargestellt sind die nur TIP39 ausgesetzten Zellen (\diamond), die 5 mmol/l L-NA ausgesetzten Zellen (\blacksquare) und die für 24 Stunden einer starken Hyperglykämie ausgesetzten Zellen (\triangle). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler. Gemessen wurden 58 Zellen normoglykämisch ohne TIP39 als Kontrollen, 54 Zellen nur mit TIP39 behandelt, 63 Zellen mit L-NA und TIP39 behandelt und 30 Zellen die zuvor einer Hyperglykämie ausgesetzt waren und mit TIP39 behandelt wurden. *: $p < 0,05$ vs. Kontrollen.

Bei einer TIP39-Konzentration von 100 nmol/l sind bei allen Frequenzen die untersuchten Kontraktionsparameter signifikant reduziert.

Dagegen scheint eine Hyperglykämie keinen relevanten Einfluss auszuüben. Die Unterschiede zwischen den nur TIP39 ausgesetzten normoglykämischen

Zellen und den TIP39 ausgesetzten hyperglykämischen Zellen waren bei keinem Parameter, bei keiner TIP39 Konzentration und bei keiner Frequenz signifikant.

4.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Eine starke Hyperglykämie über einen relativ kurzen Zeitraum hat Auswirkungen auf die Kontraktionskinetik des isolierten Kardiomyozyten. Vor allem die Relaxationsgeschwindigkeit, aber auch die Kontraktionsgeschwindigkeit sind verlangsamt. Die relative Zellverkürzung ist dagegen stärker.
2. Unter Last ist die relative Zellverkürzung bei moderaten Hyperglykämien stärker, bei starken Hyperglykämien ist sie jedoch stark eingeschränkt.
3. Die Ansprechbarkeit auf Kalzium ist vor allem bei hohen extrazellulären Kalziumkonzentrationen verringert. Deutlich wird dies vor allem durch eine Reduktion der Kontraktionsgeschwindigkeit.
4. Die β -adrenerge Stimulierbarkeit ist bei der hyperglykämischen Zelle herabgesetzt. Die relative Zellverkürzung ist hier geringer.
5. Hyperglykämie zeigt keinen Einfluss auf die Ansprechbarkeit auf TIP39 als NO vermittelter Mediator der kardialen Funktion. Unter der Wirkung von L-NA als Inhibitor der eNOS zeigt TIP39 einen deutlich repressiven Effekt auf die relative Zellverkürzung, die Kontraktionsgeschwindigkeit und die Relaxationsgeschwindigkeit.

5 Diskussion

5.1 Einfluss einer starken Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten isolierter Kardiomyozyten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Hyperglykämie die Kontraktionsgeschwindigkeit sowie die Relaxationsgeschwindigkeit bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz signifikant verlangsamt. Die R50 ist noch deutlicher, besonders bei 0,5 Hz und bei 1 Hz, verlangsamt. Die relative Zellverkürzung ist dagegen stärker und die FWHL länger. Beides war ebenfalls nur bei 0,5 Hz signifikant.

Die Tatsache, dass signifikante Unterschiede zu den Kontrollen bei einigen der erhobenen Parameter nur bei einer Stimulationsfrequenz von 0,5 Hz, einer eigentlich unphysiologisch langsamen Frequenz für das Rattenherz, gemessen werden konnte, ist nicht vollständig zu erklären. Allerdings wurde dies bei ähnlichen Experimenten auch schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [Ren J. und Davidoff A.J., 1997].

Ein Erklärungsversuch wäre, dass die Zelle bei langsameren Frequenzen auf Grund der Refraktär- und Entspannungszeiten insgesamt stärker kontrahieren kann und dadurch Unterschiede stärker hervortreten. Eventuell greifen auch bei den physiologischen Frequenzen effektivere Kompensationsmechanismen.

Nicht bestreitbar ist, dass Veränderungen bei Hyperglykämie stattfinden. Es ist davon auszugehen, dass vielleicht in geringerem Maße oder aber später, diese Kompensationsmechanismen auch das Kontraktionsverhalten bei physiologischen Frequenzen verändern.

Ren et al. zeigten 1997, dass bei Ratten, bei denen mit Streptozotozin (STZ), eine spezifisch auf die β -Zellen des Pankreas hochtoxisch wirkende Substanz, experimentell ein Diabetes ausgelöst wurde, nach 1-4 Tagen verlängerte Kontraktionszeiten und Relaxationszeiten der isolierten Kardiomyozyten auftraten. Dies entspricht den von uns erhobenen Ergebnissen. Interessant dabei ist, dass sich bei unserem Versuchsaufbau die Änderungen gegenüber den Kontrollen auf den erhöhten Glukosegehalt im Medium beschränkten, während die Versuchstiere der Arbeitsgruppe Ren et al. einen „richtigen“ Diabetes durch Zer-

störung der insulinproduzierenden Zellen hatten. Daraus kann man schließen, dass andere Faktoren als die Hyperglykämie eine eher untergeordnete Rolle bei den Veränderungen im Kontraktionsverhalten zu spielen scheinen, die Hyperglykämie ist offensichtlich der maßgebliche Faktor.

In der gleichen Veröffentlichung hat die Arbeitsgruppe die Kardiomyozyten von Ratten untersucht, die bereits acht Wochen lang einen Streptozotocin induzierten Diabetes hatten. Zusätzlich zu der hier ebenfalls auftretenden verlängerten Relaxations- und Kontraktionszeit fand man hier auch eine verringerte maximale Zellverkürzung [Ren J. et al., 1997].

In der hier vorgelegten Arbeit bei 24 Stunden inkubierten Zellen kam es dagegen eher zu einer stärkeren relativen Zellverkürzung. Man kann vermuten, dass es sich dabei um metabolisch-positive Effekte der Glukose handelt. Bereits 1895 beobachtete F.S. Locke eine Zunahme der Schlagkraft und der maximal möglichen Perfusionsdauer nach Zugabe von Glukose zu einer kristalloiden Perfusionslösung bei Experimenten mit dem isoliert arbeitenden Froschherz [Locke F.S., 1895]. Heute werden glukosehaltige Infusionslösungen, zusammen mit Kalium und Insulin, zu Infusionstherapie bei Patienten nach Operationen mit kardioplegem Herzstillstand und nach ischämischem Myokardinfarkt verwendet [Bothe W., 2002].

Die Arbeitsgruppe um Ren, diesmal unter der Leitung von A.J. Davidoff, führte im gleichen Jahr (1997) auch Versuche mit isolierten Kardiomyozyten durch, die bis zu 4 Tage lang in einem Medium inkubiert wurden, welches einen erhöhten Glukosegehalt (25 mmol/l) und eine erniedrigte Insulinkonzentration aufwies. Auch hier decken sich die Ergebnisse weitgehend mit den hier gefundenen. Wieder wurde eine reduzierte Relaxationsgeschwindigkeit gefunden, die Veränderungen bei der Kontraktionsgeschwindigkeit waren jedoch tendenziell und nicht signifikant. Bei unserem Versuchsaufbau kamen wir bei langsamen Frequenzen in einen signifikanten Bereich. Der Unterschied könnte mit der höheren Glukosekonzentration, bei uns 35 mmol/l, bei Davidoff et al. maximal 25 mmol/l, zu erklären sein. Eventuell sind die Unterschiede aber auch statistischer Natur und mit der wesentlich größeren Anzahl der von uns untersuchten Zellen zu erklären [Davidoff A. J. et al., 1997].

Die Ähnlichkeit der Ergebnisse der Versuche mit Low-Insulin-High-Glucose-Medium und denen mit nur Glukose inkubierten Zellen lässt den Schluss zu,

dass die erniedrigte Insulinkonzentration keinen Einfluss auf das Kontraktionsverhalten bei den diabetischen Zellen hat. Es zeigt, dass die Hyperglykämie an sich der entscheidende Faktor ist.

Interessant ist auch, unsere Ergebnisse mit den Änderungen im Kontraktionsverhalten bei moderater Hyperglykämie zu vergleichen. Soltanpour et al. untersuchten 2003 unter anderem das Kontraktionsverhalten isolierter Kardiomyozyten bei moderater Hyperglykämie. Gearbeitet wurde hier mit einer Konzentration von 15 mmol/l Glukose, ebenfalls über 24 Stunden [Soltanpour G., 2004]. Auch hier ist die relative Zellverkürzung bei den hyperglykämischen Zellen gesteigert, was auch in gewissem Maße für die oben beschriebene Theorie der postiv-metabolischen Wirkung der Glukoselösung spricht. Die Ergebnisse unterscheiden sich jedoch von unseren bei der Relaxationsgeschwindigkeit. Bei 15 mmol/l Glukose relaxieren die Zellen schneller als die normoglykämischen Kontrollen, im Gegensatz zu unseren mit 35 mmol/l inkubierten Zellen, welche eine signifikante Verschlechterung, das heißt Verlangsamung der Relaxation zeigen. Dies lässt nur den Schluss zu, dass pathophysiologische Veränderungen erst bei sehr hohen Glukosekonzentrationen, auftreten. Eine moderate Glukosespitze scheint der Kardiomyozyt kompensieren zu können.

Unsere Ergebnisse decken sich auch mit klinischen Studien, die bei gut eingestellten Diabetikern ohne weitere kardiale oder vaskuläre Erkrankungen oder Risikofaktoren eine bereits eingeschränkte ventrikuläre Funktion festgestellt haben [Poirier P. et al., 2001; Schannwell C.M. et al., 2002], wie auch mit Versuchen an isolierten perfundierten Rattenherzen, bei denen das Gesamtorgan verlängerte isovolumetrische Relaxationszeiten zeigte [Joffe I.I. et al., 1999].

Vergleicht man die Arbeiten von Poirier und Schannwell, so stellt man fest, dass nahezu die gleichen Veränderungen in der kardialen Funktion bei normotensiven, klinisch unauffälligen Typ II Diabetikern wie bei klinisch unauffälligen Typ I Diabetikern gefunden wurden. Dies unterstreicht die Annahme, dass der Glukosespiegel und nicht der Insulinspiegel der maßgebliche Faktor für die Entwicklung der kardialen Dysfunktion darstellt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass der Mechanismus, der im Endeffekt zur Funktionseinschränkung des Herzens bei diabetischer Kardiomyopathie führt, zum Großteil ein schon früh auftretender und auch schnell durch hohe Glukosespitzen induzierbarer, den einzelnen Kardiomyozyten betreffender Prozess sein muss.

Die bei Diabetikern beobachtete Myokard-Fibrose, der erhöhte Kollagen-Anteil und andere histopathologische Veränderungen wie sie z.B. von Saito und Hoeven beschrieben sind und die damit verbundene erhöhte Steifigkeit des Ventrikels können nicht, oder nicht allein für die kardiale Dysfunktion verantwortlich sein [Saito K. et al., 1984; van Hoeven K.H. et al., 1991].

5.2 Einfluss von Hyperglykämie auf die maximal Belastbarkeit

Um Funktionseinschränkungen der Kardiomyozyten besser einschätzen zu können und Zusammenhänge der Änderungen im Kontraktionsverhalten des einzelnen Myozyten und der Dysfunktion des Gesamtorgans zu untersuchen, wurden diese während der Kontraktionen einer Last ausgesetzt. Diese Last wurde durch Erhöhung der Mediumviskosität erreicht.

Unter Last zeigten die zwei verschiedenen Glukosekonzentrationen ausgesetzten Kardiomyozyten sehr unterschiedliche Ergebnisse. Bei einer moderaten Hyperglykämie von 15 mmol/l Glukose war die relative Zellverkürzung bei allen gemessenen Stimulationsfrequenzen wesentlich, teilweise weit über 20% stärker als bei den Kontrollen. Diese Beobachtung ist vermutlich auf den positiven metabolischen Effekt der erhöhten Glukosekonzentration zurück zu führen.

Dagegen ist bei den Zellen, die mit 35 mmol/l Glukose inkubiert waren, eine signifikante Reduktion der relativen Zellverkürzung bei 0,5 Hz und 1,0 Hz zu erkennen. Die relative Zellverkürzung ist fast 20% geringer als die der Kontrollen.

Wenn die einzelne Zelle bei diesen Bedingungen eine solche Dysfunktion zeigt, kann man daraus schließen, dass das Gesamtorgan als Zellverbund auf Grund von Veränderungen der einzelnen Zelle eine wesentlich eingeschränkte

Pumpleistung gegen eine erhöhte Nachlast aufweist. Dies ist beim Diabetiker gerade wegen der mit Diabetes assoziierten angiopathischen, besonders der arteriosklerotischen Veränderungen und dem damit einhergehenden Hypertonus von ganz besonderer Relevanz.

Poirier et al. sprechen sich in Ihren Untersuchungen für ein Screening nach linksventrikulärer diastolischer Dysfunktion auch bei gut eingestellten und normotensiven Diabetikern aus. In diesem Zusammenhang wird empfohlen, dopplersonographische Untersuchungen auch unter Belastung oder unter Durchführung des Valsalva Manövers durchzuführen, um pseudonormale Füllungsdefekte zu demaskieren [Poirier P. et al., 2001].

Unsere Ergebnisse stützen diese Befunde, bedenkt man, dass unter lastfreien Bedingungen keine signifikante Änderung der relativen Zellverkürzung zu beobachten war (siehe 4.1).

Wie zu erwarten steigerte sich die relative Zellverkürzung mit zunehmender Kalziumkonzentration. Analog dazu verringerte sich die Kontraktionsgeschwindigkeit. Dies hängt mit den limitierten Möglichkeiten der Zelle zusammen, Kalzium in den und aus dem Intrazellularraum zu transportieren. Eine hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration ermöglicht eine starke Kontraktion. Die Zelle benötigt dann aber auch mehr Zeit, die zytosolische Kalziumkonzentration über die NCX und die sarkolemmalen Kalziumkanäle, sowie die Transportmechanismen in das sarkoplasmatische Retikulum, wie die sarkoendoplasmatische-Retikulum-Kalzium-ATPase (SERCA), zu normalisieren.

Ein Unterschied zwischen den mit 35 mmol/l Glukose inkubierten Zellen und den Kontrollen war erst bei einer Kalziumkonzentration von 2 mmol/l zu beobachten. Hier verlangsamte sich die Kontraktionsgeschwindigkeit der hyperglykämischen Zellen signifikant. Bei der relativen Zellverkürzung jedoch blieben die Differenzen tendenziell.

Dies deutet darauf hin, dass die Hyperglykämie an der direkten Wirkung des Kalziums auf die Kontraktion, die Bindung des Kalziums an Troponin und der daraus resultierenden Querbrückenaktivierung, bei der von uns verwendeten Inkubationszeit und Glukosekonzentration keine wesentlichen Änderungen hervorruft, wohl aber an den Kalzium-Transportmechanismen von extra- nach intrazellulär und umgekehrt.

Das erklärt auch, warum die Unterschiede erst bei hohen extrazellulären Kalziumkonzentrationen auftreten. Man kann deshalb postulieren, dass ein Teil der NCX der einer Hyperglykämie ausgesetzten Zelle vermindert aktiv ist, oder dass die Expression vermindert ist. Bei hohen extrazellulären Kalziumkonzentrationen wäre dann die Transportkapazität der hyperglykämischen Zelle verglichen mit der in normoglykämischen Medium inkubierten Zelle früher erschöpft und damit langsamer.

Dies passt zu dem von Hattori et al 2000 veröffentlichten Befund, dass sowohl die Funktion wie auch die Expression des kardialen NCX in Herzmuskelzellen bei Ratten mit STZ induziertem Diabetes vermindert ist [Hattori Y. et al., 2000]. Unsere Befunde zeigen, dass es sich hierbei um einen schnell wirkenden Mechanismus der durch die Hyperglykämie selbst und nicht durch Insulinmangel oder andere mit Diabetes vergesellschafteten Veränderungen handeln muss.

Wie sich die Kalziumkonzentration bei diabetischen Kardiomyozyten in Diastole und Systole verändert, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Einige Veröffentlichungen sprechen von erniedrigten basalen Kalziumkonzentrationen, andere von gleichbleibenden [Lagadic-Gossman D. et al., 1996; Noda N. et al., 1992 und 1993; Yu J.Z. et al., 1997]. Unsere Ergebnisse weisen auf Grund der gleichbleibenden relativen Zellverkürzung eher auf geringe bis keine Veränderungen diesbezüglich hin.

Warum sich bei unserem Versuchsaufbau entgegen den in 5.1 diskutierten Experimenten die Relaxationsgeschwindigkeit gegenüber den Kontrollen nur tendenziell, nicht aber signifikant verändert, konnte hier nicht abschließend geklärt werden und bedarf weitergehender Analysen.

Bei beiden Versuchsgruppen verkürzten sich die Zellen erwartungsgemäß zunehmend bei steigenden Isoprenalinkonzentrationen.

Ein Einfluss auf die β -adrenerge Ansprechbarkeit der hyperglykämischen Zellen konnte besonders bei niedrigen Isoprenalinkonzentrationen gezeigt werden. Bei einer Konzentration von 0,1 nmol/l war die relative Zellverkürzung stärker als bei den Kontrollen, die Verstärkung der Zellverkürzung fiel jedoch bei Erhöhung der Isoprenalinkonzentration auf 1,0 nmol/l wesentlich geringer aus. Als

Folge waren auch die prozentualen Steigerungen, bezogen auf die Zellverkürzung bei 0,1 nmol/l, signifikant geringer.

Dies kann man als eindeutiges Indiz für eine Abschwächung der β -adrenergen Ansprechbarkeit unter dem Einfluss einer Hyperglykämie werten.

Veränderungen im Katecholaminhaushalt bei Patienten mit Diabetes und an Tiermodellen sind seit geraumer Zeit bekannt. So weiß man aus Versuchen mit Ratten, die längere Zeit einen STZ induzierten Diabetes hatten, dass das ventrikuläre Noradrenalinlevel nach ein bis zwei Monaten steigt, sich aber nach ca. vier Monaten wieder normalisiert oder sogar unter den Ausgangswert sinkt [Felten S.Y. et al., 1982].

Die Dichte der β -adrenergen Rezeptoren erhöht sich bei kurzzeitigem bzw. neu auftretendem Diabetes, normalisiert sich aber wieder, wenn ein diabetischer Status eine gewisse Zeit lang erreicht ist [Uekita K. et al., 1997].

Bei chronischem, lang anhaltendem Diabetes ist die Anzahl sowohl der α -, wie auch der β -adrenergen Rezeptoren vermindert, die Affinität der Rezeptoren zum Liganden jedoch nicht beeinträchtigt. Bei den Versuchen von Heylinger et al. wurde auch schon eine verminderte Kraftsteigerung des isolierten Papillarmuskels unter Isoprenalinexposition beschrieben [Heylinger C.E. et al., 1982]. Die Versuchstiere hatten aber mindestens acht Wochen lang einen STZ induzierten Diabetes. Interessant dabei ist, dass in unseren Versuchen mit einer nur 24 stündigen Glukosespitze ein ähnliches Ergebnis erzielt werden konnte. Die kausal für die mangelnde Ansprechbarkeit verantwortlichen Veränderungen scheinen sehr schnell einzutreten.

Eine Arbeit, die mit moderaten 24-stündigen Glukosespitzen (15 mmol/l) arbeitet, kommt bei einer Isoprenalinexposition von 100 nmol/l auf keinen signifikanten Unterschied zu den keiner Hyperglykämie ausgesetzten Zellen [Soltanpour G., 2004]. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Veränderungen in engem Zusammenhang mit der Einwirkdauer (Dauer des Diabetes) und vor allem mit der Glukosekonzentration (Blutzuckerspiegel) stehen. Es ist allerdings zu beachten, dass auch bei unserem Versuchsaufbau die geringsten Unterschiede in der relativen Zellverkürzung bei einer Isoprenalinkonzentration von 100 nmol/l zu beobachten sind.

Denkbar ist auch, dass die verminderte Zellverkürzung bei gesteigerten Isoprenalinkonzentrationen zumindest teilweise ein Folge der in 5.1 diskutierten ge-

nerellen Veränderungen in der Kontraktionskinetik der diabetischen Zelle darstellen. Eine Zelle mit jedweder kontraktilen Dysfunktion reagiert ständig anders auf stimulierende Effekte als eine gänzlich Gesunde. Für eine maßgebliche Änderung der β -adrenergen Ansprechbarkeit spricht jedoch ganz eindeutig, dass bei ersteren Versuchen nur eine Veränderung der Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeiten, aber keine signifikante Veränderung in der relativen Zellverkürzung festgestellt werden konnte, wie sie durch die β_1 -vermittelte positiv inotrope Wirkung des Isoprenalin zustande kommt.

5.3 Einfluss von TIP39 auf das Kontraktionsverhalten der isolierten Kardiomyozyten unter Normo- und Hyperglykämie

Mit TIP39 konnte unsere Arbeitsgruppe erstmals ein Faktor identifizieren, der bei verminderter NO-Bildung negativ kontraktil wirkt [Ross G. et al., 2005]. Dies lässt vermuten, dass unter Hyperglykämie, wenn also mehr ROS gebildet werden und die basale NO-Bildung sinkt, TIP39 ausschließlich negativ inotrop wirkt. Dies könnte ein neuer Mechanismus der Funktionsminderung des hyperglykämischen Herzens sein.

TIP39 zeigt einen nur geringfügigen negativen Effekt auf die relative Zellverkürzung der Kardiomyozyten. In Anwesenheit von L-NA als Hemmstoff der eNOS sind die relative Zellverkürzung, die Kontraktionsgeschwindigkeit und die Relaxationsgeschwindigkeit jedoch deutlich signifikant verringert.

Im Gegensatz dazu hat TIP39 auf die Kontraktionsparameter der einer Hyperglykämie ausgesetzten, und damit auch einer erhöhten ROS Konzentration ausgesetzten Zellen, keinen signifikanten Einfluss. Die Kontraktionskurven gleichen denen der nicht mit Glukose inkubierten Kontrollen.

Diese Ergebnisse lassen mehrere Erklärungsmöglichkeiten zu.

So könnte die Eingangs beschriebene Hypothese, dass der bei einer Hyperglykämie in Form freier Sauerstoffradikale auftretende oxidative Stress einen so großen Einfluss auf die Verfügbarkeit von NO haben würde, das dadurch analog zu der Demaskierung dieses Effektes bei Hemmung der NO Produktion durch L-NA, TIP39 seinen negativ inotropen Effekt entfalten könne, falsch sein.

Man weiß aber, dass die durch Hyperglykämie induzierten ROS in Zusammenhang mit einer Senkung der NO Konzentration über eine Stimulation der Poly(ADP-Ribose)polymerase-1 Entzündungen des Myokards hervorrufen, welche zu einem Teil für die strukturellen Veränderungen des diabetischen Herzens verantwortlich sein dürften [Szabo C. et al., 2002]. Dies ist jedoch eine längerfristig relevante Veränderung, die keine sofortige Wirkung auf das Kontraktionsverhalten hat.

Die induzierte ROS Konzentration könnte aber zu gering sein und damit das Ausmaß der Senkung der NO Konzentration. Dies könnte an der Potenz der ROS liegen, die NO Konzentration zu senken, aber auch an unserem Versuchsaufbau. Vielleicht war die Expositionszeit der Zellen zu gering um einen die NO Konzentration betreffenden Mechanismus zu induzieren.

Allerdings zeigen die in 1.5 bereits erwähnten Untersuchungen von Wenzel et al., das bei 30 mmol/l Glukose über 24 Stunden eindeutig eine um mehr als doppelt so hohe ROS Konzentration im Kardiomyozyten vorliegt wie unter normoglykämischen Bedingungen [Wenzel S. et al., 2005].

Jedoch liegen keine quantitativen Messungen bezüglich der verbleibenden NO-Konzentration vor. Direkte Vergleiche der Effekte auf die eNOS-Blockade und der Senkung des NO-Spiegels durch ROS sind so nicht möglich.

ROS könnten auch eine direkte Wirkung auf TIP39 haben und so den Effekt der erniedrigten NO Konzentration maskieren.

ROS reagieren mit NO zu Peroxinitrat. Es wäre ein weiterer Ansatz zu überlegen, ob Peroxinitrat die negativ inotrope Wirkung von TIP39 ebenso maskiert wie NO.

eNOS und die endothelständige NADPH-Oxidase können unter bestimmten Bedingungen anstatt NO, ROS produzieren [Al-Mehdi A.B. et al., 1998; Brandes R.P. et al., 1999; Wohlers G., 2001]. Auch bei Blockade von eNOS mit L-NA steigt die ROS Konzentration im Kardiomyozyten an [Wenzel S. et al., 2005].

Die Vielzahl der verschiedenen Mechanismen und ihrer Interaktionen zeigen, dass es sich hier um ein multimodales Geschehen handelt. Letztendlich werfen in diesem Punkt unsere Ergebnisse mehr Fragen auf als sie lösen. Es ergibt sich aber durch unsere Versuche kein Hinweis auf einen negativ kontraktile Effekt durch TIP39 unter Hyperglykämie.

6 Literatur

- Adghate E., (2004): Molecular and cellular basis of the aetiology and management of diabetic cardiomyopathy: A short review. *Molecular and Cellular Biochemistry* 261:187-191
- Al-Mehdi A.B., Zhao G., Dodia C., Tozawa K., Costa K., Muzykantov V., Ross C., Blecha F., Dinanuer M., Fisher A.B., (1998): Endothelial NADPH Oxidase as the source of oxidants in lungs exposed to ischemia or high K^+ . *Circulation Research* 83:730-737
- Barry W.H., Bridge J.H.B., (1993): Intracellular Kalzium homeostasis in cardiac myocytes. *Circulation* 87:1806-1815
- Beljic T., Miric M., (1994): Improved metabolic control does not reverse left ventricular filling abnormalities in newly diagnosed non-insulin-dependent diabetes patients. *Acta diabetologica* 31(3):147-150
- Bell D.S.H., (1995): Diabetic cardiomyopathy: a unique entity or a complication in coronary artery disease? *Diabetes Care* 18:708-714
- Bell D.S.H., (2003): Diabetic Cardiomyopathy. Editorial. *Diabetes Care* 26:2949-2951
- Beuckelmann D.J., Nähbauer M., Erdmann E., (1992): Intracellular Kalzium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 85:1046 -1055
- Bothe W., (2002): Hochdosis-Insulintherapie bei herzchirurgischen Patienten: Entwicklung eines postoperativen Applikationsprotokolls. Inauguraldissertation zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.
- Brandes R.P., Koddenberg G., Gwinner W., Kim D., Kruse H.J., Busse R., Mügge A., (1999): Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension* 33:1243-1249
- Cai L., Kang Y.J., (2001): Oxidative stress and cardiomyopathy: A brief review. *Cardiovascular Toxicology* 1:181–193,

- Callewaert G., (1992): Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac cells. *Cardiovascular Research* 26:923-932
- Davidoff A. J., Ren J., (1997): Low insulin and high glucose induce abnormal relaxation in cultured adult rat ventricular myocytes. *The American journal of physiology* 272:159-167
- Di Bonito P., Cuomo S., Moio N., Sibilio G., Sabatini D., Quattrin S., Capaldo B., (1996): Diastolic dysfunction in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus of short duration. *Diabetic medicine: a journal of the British Diabetic Association* 13:321-324
- Diagnostik und Therapie von Herzerkrankungen bei Diabetes mellitus. Evidenzbasierte Leitlinie DDG – Aktualisierung 05/2006
- Felten S.Y., Peterson R.G., Shea P.A., Besch H.R. Jr, Felten D.L. (1982): Effects of streptozotocin diabetes on the noradrenergic innervation of the rat heart: a longitudinal histofluorescence and neurochemical study. *Brain research bulletin*, 1982 Juni; 8(6): 593-607
- Hattori Y., Matsuda N., Kimura J., Ishitani T., Tamada A., Gando A., Kemmotsu O., Kanno M., (2000): Diminished function and expression of the cardiac Na^+ - Ca^{2+} -exchanger in diabetic rats: implication in Ca^{2+} overload. *Journal of Physiology* 527.1:85-94
- Herold, Innere Medizin 2006, Kapitel Diabetes mellitus, S. 614-633
- Hess P., (1988): Elementary properties of cardiac Kalzium channels: a brief review. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 66:1218-1223
- Heyliger C.E., Pierce G.N., Singal P. K., Beamish R. E., Dhalla N. S. (1982): Cardiac alpha- and beta-adrenergic receptor alterations in diabetic cardiomyopathy. *Basic Research in Cardiology* 77:610-618
- Joffe I.I., Travers K.E., Perreault-Micale C.L., Hampton T., Katz S.E., Morgan J.P., Douglas P.S., (1999): Abnormal cardiac function in the streptozotocin-induced non-insulin-dependent diabetic rat: non-invasive assessment with Doppler echocardiography and contribution of the nitric oxide pathway. *Journal of the American College of Cardiology* 34:2111–2119
- Kamenzin S., (1998): Kontraktilität des isolierten menschlichen Kardiomyozyten. Einfluß von Kalzium, Isoproterenol, Stimulationsfrequenz, Sti-

mulationspause und Thapsigargin. Inauguraldissertation zur Erlangung des Medizinischen Doktorgrades der Medizinischen Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

- Kannel W.B., Hjortland M.C., Castelli W.P., (1974): Role of diabetes in congestive heart failure: the Framingham Study. American Journal of Cardiology 34:29-34
- Lagadic-Gossmann D., Buckler K. J., Le Prigent K., Feuvray D. (1996): Altered Ca^{2+} handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. The American journal of physiology 270:1529-1537
- Locke, F. S. (1895). Towards the ideal artificial circulating fluid for the isolated frogs heart. Journal of Physiology - London 18:332-333
- Morgan JP., Erny R.E., Allen P.D., Grossmann W., Gwathway J.K., (1990): Abnormal intracellular Kalzium handling, a major cause of systolic and diastolic dysfunction in ventricular myocardium from patients with heart failure. Circulation 81:21-23
- Noda N., Hayashi H., Miyata H., Suzuki S., Kobayashi A., Yamazaki N., (1992): Cystolic Ca^{2+} concentration and pH of diabetic rat myocytes during metabolic inhibition. Journal of molecular and cellular cardiology 24:435-446.
- Noda N., Hayashi H., Satoh H., Terada H., Hirano M., Kobayashi A., Yamazaki N., (1993): Ca^{2+} transients and cell shortening in diabetic rat ventricular myocytes. Japanese circulation journal 57:449-457
- Papasani M.R., Gensure R.C., Yan Y.L., Gunes Y., Postlethwait J.H., Ponugoti B., John M.R., Juppner H., Rubin D.A., (2004): Identification and characterization of the zebrafish and fugu genes encoding tuberoinfundibular peptide 39 (TIP39). Endocrinology 145:5294-5304
- Piper H.M., Probst I., Schwartz P., Hutter F.J., Spieckermann P.G. (1982): Culturing of Kalzium stable adult cardiac myocytes. Journal of molecular and cellular cardiology 14:397-412
- Poirier P., Bogaty P., Garneau C., Marois L., Dumesnil J.G., (2001): Diastolic dysfunction in normotensive men with well-controlled type 2 diabe-

tes: importance of maneuvers in echocardiographic screening for preclinical diabetic cardiomyopathy. *Diabetes Care* 24:5-10

- Raev DC., (1994): Which left ventricular function is impaired earlier in the evolution of diabetic cardiomyopathy? An echocardiographic study of young type I diabetic patients. *Diabetes Care* 17:633-639
- Redfield M.M., Jacobsen S.J., Burnett J.C., Mahoney D.W., Bailey K.R., Rodeheffer R.J., (2003): Burden of systolic and diastolic ventricular dysfunction in the community: appreciating the scope of the heart failure epidemic. *The journal of the American Medical Association* 289:194-202
- Ren J., Davidoff A.J., (1997): Diabetes rapidly induces contractile dysfunctions in isolated ventricular myocytes. *The American journal of physiology*, 272:148-158
- Ringer S., (1882): Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *Journal of Physiology London* 2:380-393
- Ross G., Engel Ph., Abdallah Y., Kummer W., Schlüter K.D., (2005): Tuberinfundibular Peptide of 39 Residues: A New Mediator of Cardiac Function via Nitric Oxide Production in the Rat Heart. *Endocrinology* 146:2221–2228
- Rubler S., Dlugash J., Yuceoglu Y.z., Kumral T., Branwood A.W., Grishman A. (1972): New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *The American Journal of cardiology* 30:595-602
- Saito K., Nishi S., Kashima T., Tanaka H., (1984): Histologic and ultrastructural studies on the myocardium in spontaneously diabetic KK mice: a new animal model of cardiomyopathy. *American Journal of Cardiology* 53:320-323
- Schannwell C.M., Schneppenheim M., Perings S., Plehn G., Strauer B.E. (2002): Left ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy. *Cardiology* 98:33-39
- Soltanpour G., (2004): Einfluss von neurohumoralen Faktoren und moderater Hyperglykämie auf das Kontraktionsverhalten ventrikulärer Herzmus-

kelzellen. Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorgrades der Medizinischen Fakultät Gießen

- Statistisches Bundesamt, Pressemitteilung Nr. 478 vom 11.11.2005: Zahl der Diabetiker-Toten weiter ansteigend.
- Szabo C., (2002): PARP as a drug target for the therapy of diabetic cardiovascular dysfunction. *Drug news & perspectives* 15:197-205
- Uekita K., Tobise K., Onodera S., (1997): Enhancement of the cardiac beta-adrenergic system at an early diabetic state in spontaneously diabetic Chinese hamsters. *Japanese circulation journal* 61:64-73
- Usdin T.B., Dobolyi A., Ueda H., Palkovits M. (2003): Emerging functions for tuberoinfundibular peptide of 39 residues. *Trends in endocrinology and metabolism* 14:14-19
- Usdin T.B., Hoare S.R., Wang T., Mezey E., Kowalak J.A. (1999): TIP39: a new neuropeptide and PTH2 receptor agonist from hypothalamus. *Nature neuroscience* 2:941-943
- van Hoeven K.H., Factor S.M., (1990): A comparison of the pathological spectrum of hypertensive, diabetic, and hypertensive-diabetic heart disease. *Circulation* 82:848-855
- van Hoeven K.H., Factor S.M., (1991): The diabetic heart: clinical, experimental and pathological features. *Acta cardiologica* 46:329-339
- Wells W., Bredt D., Furchgott R., Ignarro L, Marletta M., Murad F., Snyder S., Tannenbaum S., Vane J. (2000): Von Sprengstoffen Zum Gas, Das Heilt: Stickoxid in Biologie und Medizin. *Jenseits von Entdeckungen®: Der Weg von Forschung zum Nutzen für die Menschheit*, U.S. National Academy of Sciences, Mai 2000, <http://www7.nationalacademies.org/germanbeyonddiscovery/Stickoxid.html>
- Wenzel S., Rohde C., Wingerning S., Roth J., Kojda G., Schluter K.D. (2007): Lack of Endothelial NO Synthase-Derived NO Formation Favors Hypertrophy in Adult Ventricular Cardiomyocytes. *Hypertension* 49:193-200

- Wenzel S., Soltanpour G., Schlüter K.-D., (2005): No correlation between the P38 MAPK pathway and the contractile dysfunction in diabetic cardiomyocytes. *European Journal of physiology* 451:328-337
- Wohlers G., (2001): Experimentelle Untersuchungen zum molekularen Mechanismus der Monozyten-Endothelzell-Interaktion durch Salicylsäure-derivate in vitro. Dissertation zur Erlangung eines Dr. rer. nat. des Fachbereichs Chemie der Universität Hamburg
- Yu J.Z., Rodrigues B., McNeill J.H., (1997): Intracellular Calcium levels are unchanged in the diabetic heart. *Cardiovascular Research* 34:91-98

7 Zusammenfassung

Die diabetische Kardiomyopathie ist ein mittlerweile anerkanntes, eigenständiges Krankheitsbild. Als Ursachen werden Veränderungen der Kalziumwirkung, der Katecholaminwirkung sowie der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) diskutiert. In dieser Arbeit wurde der Einfluss einer Hyperglykämie auf die verschiedenen Kontraktionsparameter isolierter Kardiomyozyten sowie die Veränderung der Wirkung oben genannter Faktoren an der hyperglykämischen Zelle untersucht.

Des Weiteren wurde untersucht, welchen Einfluss Tuberoinfundibuläres Peptid (TIP39) als über die NO Produktion wirkender Mediator kardialer Funktion auf die Kontraktionseigenschaften der Zelle unter Hyperglykämie hat. Überprüft wurde damit die Hypothese, dass die durch Hyperglykämie induzierten ROS durch Reaktion mit NO zu Peroxinitrat die NO-Konzentration im Kardiomyozyten senken. Dies könnte ein weiterer Mechanismus sein, wodurch ROS neben der direkt schädigenden Wirkung, dem diabetischen Herzen schaden.

Gearbeitet wurde mit isolierten Kardiomyozyten adulter Ratten, welche für 24 Stunden einer starken Hyperglykämie von 35 mmol/l, einer moderaten Hyperglykämie von 15 mmol/l bzw. einem normoglykämischen Medium von 5 mmol/l ausgesetzt waren. Je nach Versuchsaufbau wurden zusätzlich Messungen mit verschiedenen Mediumkalziumkonzentrationen, Mediumviskositäten, Isoprenalinkonzentrationen und verschiedenen Konzentrationen an TIP39 durchgeführt.

Die Kontraktionsparameter wurden mit einem Video-Gesteuerten Zellgrenzenerkennungssystem gemessen.

Bei den für 24 Stunden einer starken Hyperglykämie ausgesetzten Zellen verlangsamte sich vor allem die Relaxationsgeschwindigkeit. Unter Last zeigte sich bei moderater Hyperglykämie eine verstärkte, bei starker Hyperglykämie jedoch eine stark eingeschränkte Zellverkürzung.

Die Ansprechbarkeit auf Kalzium war vor allem bei hohen extrazellulären Kalziumkonzentrationen verringert. Dies zeigte sich besonders in einer Reduktion

der Kontraktionsgeschwindigkeit. Auch die β -adrenerge Stimulierbarkeit war bei der hyperglykämischen Zelle herabgesetzt. Hier wurde der Unterschied besonders bei der relativen Zellverkürzung deutlich.

Hyperglykämie zeigt keinen Einfluss auf die Ansprechbarkeit auf TIP39 als NO vermittelter Mediator der kardialen Funktion. Unter der Wirkung von L-NA als Inhibitor der eNOS zeigt TIP39 einen deutlich repressiven Effekt auf die relative Zellverkürzung, die Kontraktionsgeschwindigkeit und die Relaxationsgeschwindigkeit.

Es sind also nicht nur die langfristigen Schäden eines Diabetes wie Mikro- und Makroangiopathie oder verschiedene histopathologische Veränderungen für die diabetische Kardiomyopathie verantwortlich, sondern bereits nach kurzen Glukosespitzen zeigen sich Veränderungen in der Kontraktionskinetik der Zellen. Besonders deutlich wird dies unter Last.

TIP39 wurde eindeutig als Mediator kardialer Funktion über die NO Produktion identifiziert, jedoch hat eine Hyperglykämie keinen Einfluss auf dessen Wirkung. Demnach hat eine Hyperglykämie bzw. die durch diese induzierten ROS keinen signifikanten Einfluss auf die NO Konzentration im Kardiomyozyten.

Abstract

Diabetic cardiomyopathy is meanwhile accepted autonomous disease. Differences in calcium and catecholamine signalling and the formation of reactive oxygen species (ROS) are discussed as important factors in the pathogenesis.

In this study the influence of hyperglycaemia on the contraction of cardiomyocytes and on the effects of the above mentioned factors were investigated.

In addition we examined the influence of NO-producing Tuberoinfundibular Peptid of 39 Residues (TIP39) on the contraction parameters of cardiomyocytes under normoglycaemic and hyperglycaemic conditions.

In hyperglycaemia, ROS are elevated and can react to peroxinitrat with NO, lowering the level of NO. By this mechanism ROS may harm the diabetic heart besides its direct damage.

Isolated cardiomyocytes of adult rats were incubated for 24 hours with a strong hyperglycaemia of 35 mmol/l, a moderate hyperglycaemia of 15 mmol/l or in normoglycaemic medium of 5 mmol/l glucose. The contraction parameters were measured using a video-based cell edge detection system. Contraction parameters were measured using different concentrations of calcium, isoprenalin, increased viscosity and different concentrations of TIP39.

Under strong hyperglycaemia the cardiomyocytes showed significant slower relaxation times. Under load the cells incubated with a moderate hyperglycaemia showed a stronger relative cell-shortening, the cells incubated with strong hyperglycaemia showed a restricted cell-shortening.

The positive influence of calcium on the contractility was especially reduced at high extra cellular calcium concentrations under hyperglycaemia, specifically a reduced contraction-speed was found. The β -adrenergic responsiveness was reduced at the hyperglycaemic cell, measurements showed a significantly reduced cell-shortening.

Hyperglycamia showed no effect on the influence of TIP39 as a mediator of cardiac function via the NO production. Under influence of L-NA as an inhibi-

tor of the NOS, TIP39 showed a significant repressive effect on the cell-shortening, the contraction-speed and the relaxation-speed.

So it is not only the long-term damage of a diabetes like micro- and macroangiopathy and different histopathological changes which causes diabetic-cardiomyopathy, rather short but strong periods of hyperglycaemia changes the contraction-kinetic of the cells. Especially under load these changes were shown.

TIP39 was clearly identified as a mediator of cardiac function via NO production, but a hyperglycaemia had no influence to its effects. This shows that hyperglycaemia and the elevated levels of ROS under hyperglycaemia respectively have no significant influence on the intracellular NO concentration of the cardiomyocyte.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name	Philipp Engel
Geburtsdatum	23.06.1977
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Dr. Bernhard-Heinrich Engel Veronika Engel

Schulbildung:

1983 – 1987	St. Michael Grundschule Arnsberg
1987 – 1996	St. Ursula Gymnasium Arnsberg, Abitur

Zivildienst:

1996 – 1997	Rettungsdienst Stadt Soest
-------------	----------------------------

Akademische Ausbildung:

1998 – 2006	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
	04/2003 Erstes Staatsexamen
	03/2005 Zweites Staatsexamen
	04/2006 Drittes Staatsexamen und Erhalt der ärztlichen Approbation

Ärztliche Tätigkeit:

seit 12/2006	Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik II des St. Josefs-Hospital, Wiesbaden
--------------	---

9 Danksagung

Ich danke

ganz besonders herzlich Herrn Prof. Dr. K.-D. Schlüter für die Bereitstellung des Themas, seine exzellente Betreuung und seine große Geduld,

allen Mitarbeitern des Physiologischen Instituts der Universität Gießen für ihre Hilfe und Unterstützung, insbesondere Frau Daniela Schreiber, Herrn Sergej Kechter und Frau Nadine Woitasky,

Frau Dorothea Closhen, die immer eine Quelle der Inspiration und Motivation für mich war,

meinen Eltern, die mir diesen Weg ermöglicht haben.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten.